

**Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit
der Hepatomzelllinie Hep G2 im Vergleich zu
Primärkulturen der Wistarratte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der

Humboldt-Universität zu Berlin

von

Katrin Imke Mühlenfeld

geboren am 11.8.1968, Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. J.P. Rabe

Gutachter: 1. Prof. Dr. habil. A. Langner

2. Prof. Dr. habil. H.-H. Borchert

3. PD Dr. habil. A. Baumann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.1999

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
2	Charakterisierung der verwendeten in-vitro-Testsysteme.....	8
2.1	Die Zellkulturen	8
2.1.1	Die Hep G2-Kultur	8
2.1.1.1	Morphologie.....	8
2.1.1.2	Kultivierung.....	10
2.1.2	Die Hepatozytenkultur	13
2.1.2.1	Isolation der Hepatozyten	14
2.1.2.2	Kultivierung.....	16
2.1.3	Die Lymphozytenkultur	17
2.1.3.1	Isolation.....	18
2.1.3.2	Kultivierung.....	19
2.2	Subzelluläre Fraktionen	20
2.3	Fremdstoffmetabolische Charakterisierung.....	22
2.3.1	7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung	23
2.3.1.1	7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen.....	24
2.3.1.2	7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung in Zellhomogenaten und in subzellulären Fraktionen.....	28
2.3.1.3	7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung durch Rattenlymphozytenkulturen	29
2.3.2	7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung	30
2.3.2.1	7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen.....	31
2.3.2.2	7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung durch Zellhomogenate und subzelluläre Fraktionen	32
2.3.3	Aminophenazon-N-demethylierung	34
2.3.3.1	Aminophenazon-N-demethylierung durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen.....	35
2.3.3.2	Aminophenazon-N-demethylierung durch Zellhomogenate und isolierte Zellorganellen.....	36
2.3.4	4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion.....	37
2.3.4.1	4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen.....	39
2.3.4.2	4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion durch Zellhomogenate und subzelluläre Fraktionen	40
2.3.4.3	4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion durch Rattenlymphozytenkulturen ...	41

2.3.5	p-Nitrophenol-Konjugation	42
2.3.5.1	p-Nitrophenolkonjugation durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen	44
2.3.5.2	p-Nitrophenolkonjugation in Zellhomogenaten und subzellulären Fraktionen	45
3	Untersuchungen zur Biotransformation von 3 potentiellen	
	Arzneistoffen durch Hep G2-Zellen	48
3.1	AWD 100-041	48
3.1.1	Aufklärung der durch Hep G2-Kulturen gebildeten Metaboliten	49
3.1.2	Vergleich des Metabolitenspektrums von Hep G2-Zellen mit Versuchen an der Wistar-Ratte	51
3.2	AR 12463	53
3.2.1	Aufklärung der durch Hep G2-Kulturen gebildeten Metaboliten	53
3.2.2	Vergleich des Metabolitenspektrums von Hep G2-Zellen mit Versuchen an der Wistar-Ratte	56
3.3	FLM 5011	57
3.3.1	Aufklärung der durch Hep G2-Kulturen gebildeten Metaboliten	58
3.3.2	Vergleich des Metabolitenspektrums von Hep G2-Zellen mit Versuchen an der Wistar-Ratte	61
4	Zytotoxizitäts- und Proliferationsuntersuchungen mit Hilfe von Hep G2-Zellen	64
4.1	Proliferation und Zytotoxizität	64
4.1.1	Die Testsysteme	64
4.1.1.1	Der LDH Test	64
4.1.1.2	Bestimmung des DNA-Gehalts mit bisBenzimid	66
4.1.1.3	Bestimmung des Proteingehalts mit Amidoschwarz	66
4.1.2	Die Testsubstanzen	67
4.1.2.1	AWD 100-041	68
4.1.2.2	AR 12463	69
4.1.2.3	FLM 5011	71
4.1.2.4	Solanum lycopersicon	73
4.1.2.5	3-Methylcholanthren	77
4.1.2.6	Phenobarbital	79
4.1.2.7	Clofibrat	80
4.1.2.8	DMSO	82
4.1.2.9	Vergleich von DMSO mit anderen Lösungsmitteln	83
4.1.2.10	7-Ethoxyresorufin	84
4.2	Apoptose	85

4.2.1	Erkennen von Apoptose	87
4.2.2	Nachweis von apoptotischen Vorgängen nach Inkubation mit FLM 5011	88
5	Diskussion und Zusammenfassung	94
6	Experimenteller Teil	104
6.1	Geräte.....	104
6.2	Substanzen und Kulturzubehör.....	105
6.3	Zellkulturen und Versuchstiere	105
6.4	Sterilisation.....	105
6.5	Kultivierung der Hep G2-Zellen	106
6.5.1	Medium und Kultivierungsbedingungen	107
6.5.2	Kultivierung an Cytodex®	108
6.6	Kultivierung der Hepatozyten	108
6.6.1	Isolation.....	108
6.6.2	Medium und Kultivierungsbedingungen	110
6.7	Kultivierung der Lymphozyten	111
6.7.1	Isolation.....	111
6.7.2	Medium und Kultivierungsbedingungen	111
6.8	Modellreaktionen	111
6.8.1	7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung	112
6.8.2	7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung	112
6.8.3	Aminophenazon-N-demethylierung	113
6.8.4	4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion	113
6.8.5	p-Nitrophenol-Konjugation	114
6.8.6	Bestimmung der Enzymaktivitäten in Ultraschall-behandelten Zellkulturen	114
6.8.7	Bestimmung der Enzymaktivitäten in isolierten Zellorganellen von Hep G2-Zellen	114
6.9	Statistische Auswertung.....	116
6.10	Biotransformation von potentiellen Arzneistoffen.....	116
6.10.1	AWD 100-041.....	116
6.10.1.1	Gewinnung der Metaboliten.....	116
6.10.1.2	Isolation und Identifikation der Metaboliten mittels HPLC	116
6.10.1.3	Identifikation der Metaboliten mittels DC	117
6.10.1.4	Identifizierung der Metaboliten mittels MS	117
6.10.2	AR 12463	117
6.10.2.1	Gewinnung der Metaboliten.....	117
6.10.2.2	Isolation und Identifikation der Metaboliten mittels HPLC	118

6.10.2.3 Identifikation der Metaboliten mittels DC	118
6.10.2.4 Identifikation der Metaboliten mittels von GC/MS	118
6.10.3 FLM 5011	119
6.10.3.1 Gewinnung der Metaboliten.....	119
6.10.3.2 Isolation und Identifikation der Metaboliten mittels HPLC	119
6.10.3.3 Identifikation der Metaboliten mittels DC	119
6.10.3.4 Identifizierung der Metaboliten mittels MS	119
6.10.3.5 Bestimmung der Umsatzrate	120
6.11 Zytotoxizitätsbestimmungen	120
6.11.1 Der Amidoschwarztest.....	120
6.11.2 Der LDH Test	121
6.11.3 Bestimmung der Zytotoxizität durch Quantifizieren des DNA-Gehalts	121
6.12 Nachweismethoden für Apoptose	122
6.12.1 DNA-Leiter.....	122
6.12.2 Anfärben von apoptotischen Zellen mit Annexin-V-Biotin	123
6.12.3 ApoAlert FLICE Assay von CLONTECH Laboratories	124
7 Literatur	125

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bcl-2	<i>B-cell lymphoma</i>
CYP	Cytochrom P450
DAB	4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKS	fetales Kälberserum
GC	Gaschromatographie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ICE	<i>Interleukin-1β converting enzyme</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
3-MC	3-Methylcholanthren
MS	Massenspektroskopie
NAD	Nicotinamid-adenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenindinukleotid (reduziert)
NADP	Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat (reduziert)
PB	Phenobarbital
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor
PARP	Poly(ADP-Ribose)polymerase
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
UDP	Uridindiphosphat

1 Einleitung und Problemstellung

Tierexperimente werden im allgemeinen in der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung sowie zur Prüfung und Charakterisierung der Verträglichkeit und Unbedenklichkeit vieler Substanzen eingesetzt. Ein großer Teil dieser Untersuchungen wird im Rahmen der Entwicklung und Prüfung von Arzneimitteln nach §2 des Arzneimittelgesetzes durchgeführt.

In den letzten Jahren werden zunehmend Ersatz- bzw. Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen entwickelt und erfolgreich eingesetzt [z.B. 32, 88]. Dabei handelt es sich um in vitro-Testsysteme, die einfache oder komplexe physiologische und biochemische bzw. pathophysiologische und pathobiochemische Prozesse bzw. Reaktionen des Gesamtorganismus repräsentieren. Mit ihnen können üblicherweise, wenn sie in der Pharmaforschung angewendet werden, Aspekte der Wirkung, Nebenwirkung und Toxizität von Wirkstoffen aufgeklärt werden. Darüber hinaus ergeben sich aber auch Möglichkeiten, spezielle Fragen, wie Mechanismus und Lokalisierung von Wirkung und Disposition von Arzneistoffen zu bearbeiten. Ein großes Potential von in vitro-Systemen ist auch in der Produktion und Gewinnung von Wirkstoffen bzw. Diagnostika zu finden.

Die einzelnen Modelle und Testsysteme gewinnen angesichts der Tierversuchproblematik zunehmend an Bedeutung. Eine allgemeine Zielstellung besteht dabei in einer Einschränkung der Zahl der Versuchstiere oder im Verzicht auf ihren Einsatz. Die entsprechenden Ergebnisse aus den in vitro-Untersuchungen sollten jedoch prinzipiell keinen anderen Aussagewert haben als jene aus Studien am Ganztier.

Als grundsätzliches Konzept zur Verminderung von Tierversuchen und als Leitidee von Ersatz- und Ergänzungsmethoden wurde von Russel und Burch [55] das 3R-Prinzip „*replace, reduce and refine*“ eingeführt. Dieses Prinzip sieht vor, daß entweder die Tierversuche durch in vitro-Methoden ersetzt werden (→ *replace*) oder die Tierversuche durch sorgfältige Validierung, Informationsgewinn und -austausch sowie interdisziplinäre Zusammenarbeit vermindert werden (→ *reduce*). Eine qualifizierte Haltung der Versuchstiere, die Gesundheitsvorsorge sowie das Vermeiden von unnötigen Qualen, z.B. durch Narkose, soll die Versuchstiere entlasten (→ *refine*).

Neben der Versuchstierproblematik ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung von in vitro-Methoden aus einer Erhöhung des Erkenntnisgewinnes. Viele Untersuchungen, die im Zusammenhang mit der Arzneistoffentwicklung stattfinden, sind am Ganztier nicht möglich oder führen zu fehlerhaften Aussagen.

Die Vielfalt und die unterschiedliche Komplexität der in vitro-Modelle ergeben sich aus den Formen der biologischen Organisationsstufen. Prinzipiell reichen die Systeme vom isolierten Enzym bis hin zum isolierten Organ bzw. Organsystem. Dabei kann der Grad der Einschränkung

von Tierversuchen sehr unterschiedlich sein. Das gilt auch für die Möglichkeiten der Versuchsansätze und dem entsprechenden Ergebniserfolg. Die Etablierung und Weiterentwicklung der entsprechenden Methoden in dieser Hinsicht hängt stark vom Erkenntnisstand der Biologie, Biochemie und Pharmakologie, insbesondere aber der zell- und molekularbiologischen bzw. gentechnologischen Disziplinen ab.

Ein sinnvolles Zusammenwirken unterschiedlicher Testsysteme, die einen unterschiedlichen Komplexitätsgrad haben, kommt in vivo-Verhältnissen näher und kann die Aussagekraft erhöhen. Trotz des relativ hohen Entwicklungsstandes der einzelnen Ersatz- und Ergänzungsmethoden steht ihrer Vorteilhaftigkeit eine Reihe von Nachteilen gegenüber (siehe Tabelle 1-1).

Vorteile von in-vitro-Testsystemen	Nachteile von in-vitro-Testsystemen
<ul style="list-style-type: none"> • Ausschaltung systemischer Einflüsse • einfache Validierung der Versuchsbedingungen • Prüfungen an unterschiedlichen Testsystemen pro Dosis möglich • zeitabhängige wiederholte oder gleichzeitig mehrfache Probenentnahme möglich • geringe Mengen an Testchemikalien erforderlich • humane Zellen und Gewebe können getestet werden • geringes Anfallen von Testrückständen • Reduzierung der Tierversuchszahlen 	<ul style="list-style-type: none"> • kein Erfassen von <ul style="list-style-type: none"> – systemischen Einflüssen – komplexen toxischen Wirkungen, z.B. Kanzerogenität – chronischen Effekten – Heilungsprozessen – pharmakokinetischen Aspekten • unzureichende Erfassung von organspezifischen Aspekten • keine behördliche Akzeptanz der sicherheitstoxikologischen Bewertung von Arzneimitteln • keine internationale behördliche Akzeptanz der toxikologischen Einstufung und Kennzeichnung chemischer Stoffe und Zubereitungen

Tabelle 1-1: Vor- und Nachteile von in-vitro-Testsystemen in der Toxikologie [100]

Die Vorzüge von beispielsweise molekularen und zellulären Testmethoden können gleichzeitig begrenzende Bedingungen sein. So hat ein membrangebundenes Enzym andere Eigenschaften als das gleiche Enzym nach Isolation und Reinigung in löslicher Form. Eine Zelle im Gewebeverband eines Organs wird auf einen Fremdstoff anders reagieren als die gleiche Zelle in isolierter Form in Kultur. Die Einschaltung übergeordneter humoraler und nervaler Steuermechanismen, das Vorliegen höherer Integrationsstufen bestimmter Leistungen der Zelle,

beeinflusst sowohl den Effekt des Wirkstoffes als auch mögliche Reaktionen der Zelle auf den Fremdstoff. Dementsprechend können zelluläre oder subzelluläre Systeme oft nur Teilfunktion von Organen zeigen und damit begrenzende Aufschlüsse über die Art und den Grad des in vivo zu erwartenden Effektes geben.

Im Rahmen der Entwicklung neuer Arzneistoffe nehmen die Untersuchungen zur Biotransformation einen besonderen Stellenwert ein. Sie sind entsprechend dem Arzneimittelgesetz vorgeschrieben. Der Fremdstoffmetabolismus als komplexer Prozeß aller biochemischen Veränderungen an Wirkstoffen führt zu vielfältigen Konsequenzen für die verabreichte Substanz. Die Charakterisierung der Verstoffwechselung ist deshalb so wichtig, weil aus den entsprechenden Ergebnissen sowohl Aussagen zur Erklärung der Pharmakokinetik als auch zum Mechanismus von Nebenwirkungen und Toxizität abgeleitet werden können. Darüber hinaus können die Strukturen isolierter und identifizierter Metaboliten einen Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit höherer Wirksamkeit oder anderer Wirkqualität darstellen.

Der Einsatz von in vitro-Methoden zu Untersuchungen der Biotransformation neuer Wirkstoffe wird zunehmend von vielen Institutionen aufgenommen. Im allgemeinen handelt es sich bei den Testsystemen um für den Fremdstoffmetabolismus relevante isolierte perfundierte Organe, isolierte und kultivierte Zellen dieser Organe, subzelluläre Strukturen und isolierte Enzyme.

Den größten Teil unter den in vitro-Methoden nehmen die Zellkulturen ein. Da die Leber den Großteil des Metabolismus von Fremdstoffen im Organismus übernimmt, werden für die Untersuchungen vor allem Primärkulturen von Hepatozyten verwendet, wenn komplexe fremdstoff-metabolische enzymatische Aktivitäten genutzt werden sollen. Die Leberparenchymzellen als hoch spezialisierte Zellen verlieren allerdings nach Isolation und Kultivierung viele organspezifische Eigenschaften und entdifferenzieren nach einer bestimmten Kultivierungsdauer mit der Konsequenz, daß die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten abnehmen oder sogar verloren gehen [7]. Dabei hängen diese Veränderungen entscheidend von folgenden Faktoren ab:

- geeignete extrazelluläre Matrix für Adhäsion und Ausbreitung der Zellen
- adäquate Nährstoff- und Hormonzufuhr
- Abtransport von Stoffwechselprodukten
- ausreichender Gasaustausch
- Möglichkeiten zur dreidimensionalen Anordnung der Hepatozyten

Die allgemein üblichen Kultivierungstechniken, wie Suspensions- und Monolayerkulturen, erfüllen diese Anforderungen nicht oder nur unzureichend. Daher sind einige Manipulationen vorgenommen worden, die Aktivitäten zellspezifischer Leistungen über einen längeren Zeitraum

zu erhalten. Dazu gehören u.a.:

- Zusatz von induzierenden Substanzen zum Nährmedium, z.B. Phenobarbital oder Dexamethason
- Sandwichkulturen durch Einbetten der Zellen in Kollagen [27]
- Co-Kulturen mit Zelllinien [21]
- Immobilisierung der Zellen durch Binden an einen hochmolekularen Träger
- Verwendung von Leberschnitten
- Perfusion von Monolayerkulturen [36] und Kulturen mit dreidimensionaler Anordnung der Zellen in Bioreaktorsystemen [38]
- Verwendung von Zelllinien der Hepatozyten, z.B. Hepatomzellen
- Verwendung von gentransformierten Zellen, z.B. V79-Zellen [20]
- Immortalisierung von primären Hepatozyten, durch z.B. Transfektion mit SV 40 Viren [37]

Beim Arbeiten mit Hepatozytenkulturen ist die Wahl der verwendeten Tierspezies eine wichtige Frage. Sie wird von der Finanzierbarkeit, Praktikabilität und Übertragbarkeit auf den Menschen bestimmt. Rattenhepatozyten bieten den Vorteil der guten Vergleichbarkeit, da sehr viele Daten zum Fremdstoffmetabolismus mit diesem System vorliegen. Das gilt auch für in vivo-Daten, da die Ratte üblicherweise in der präklinischen Phase der Arzneistoffentwicklung, insbesondere bei Untersuchungen zur Biotransformation und zur Toxizität, herangezogen wird. Außerdem ergeben sich vergleichbare Voraussetzungen hinsichtlich der genetischen Ausstattung, da die Laborratte in der Regel aus Inzuchtstämmen stammt.

Ein besonderes Problem ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Dies kann umgangen werden, indem humane Zellen verwendet werden. Humanes Lebergewebe, z.B. aus Biopsiematerial, für entsprechende Primärkulturen zu erhalten, ist derzeit aus unterschiedlichen Gründen sehr schwierig und teuer. Daher kommen zunehmend humane Leberzelllinien zum Einsatz. Da diese Zellen genetisch identisch sind und aufwendige Zellmorphologie bzw. -aktivität einschränkende Isolierung und Reinigung wegfallen, werden gut reproduzierbare Ergebnisse erreicht. Etablierte Zelllinien, die bei Zellbanken zu erhalten sind, lassen sich wesentlich einfacher handhaben als primäre Zellkulturen. Sie können zusätzlich durch gentechnologische Methoden mit spezifischen Zelleistungen, wie z.B. Cytochrom P450-Isoenzyme oder auch mit deren Gendefekten, ausgestattet werden.

Die Arbeit mit permanenten Zelllinien hat den Vorteil, daß diese eine sehr hohe Lebensdauer haben und über Jahre hinweg durch Passagieren vermehrt werden können. Im Gegensatz zu nicht proliferierenden Zellen, wie den Hepatozyten, erfolgt keine Begrenzung des nutzbaren Materials. Weiterhin ist man von Versuchstieren wegen des Wegfallens der Präparation unabhängig.

Zelllinien haben aber auch Nachteile. Bei der Immortalisierung der Zellen ist zu bedenken, daß Entdifferenzierungsprozesse stattfinden können und somit einige zellspezifische Funktionen verloren gehen können. Transformierte kontinuierliche Zellen sind in der Regel genetisch instabiler als Zelllinien mit begrenzter Lebensdauer. Ferner ist die spontane Mutationsrate - wahrscheinlich als Folge der hohen Proliferation [34] - höher. Entstandene Mutantenzellen werden nicht eliminiert, sondern weiter kultiviert. Sofern sie eine höhere Proliferationsrate haben, bestimmen sie nach einigen Passagen die Zellkultur.

Der mögliche Einsatz von Zellkulturen in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung ist in Abbildung 1-1 dargestellt:

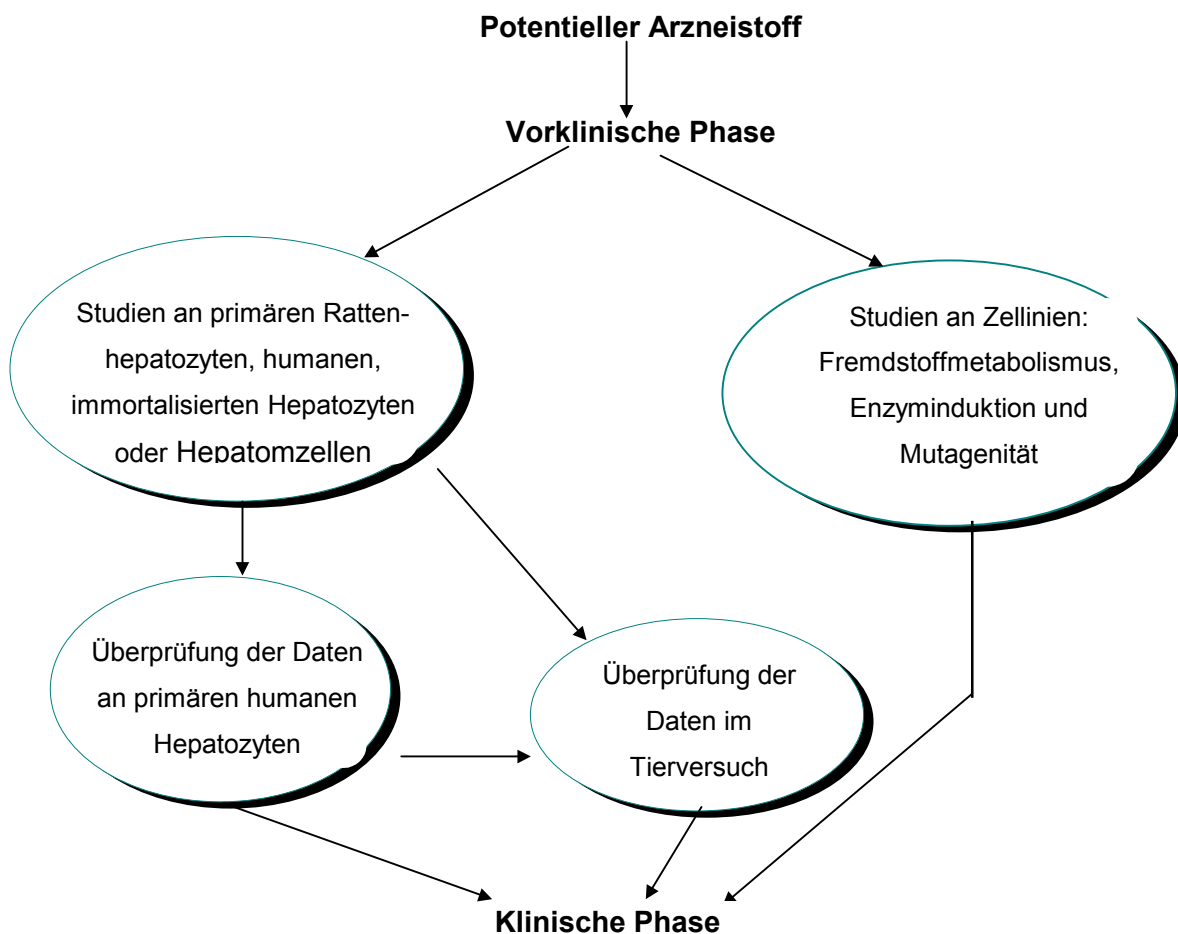


Abbildung 1-1: Möglicher Einsatz von Zellkulturen für Biotransformationsuntersuchungen in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung

Für die erfolgreiche Untersuchung zur Biotransformation und der Toxizität in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung ist es auf Grund der beschriebenen Probleme entscheidend, die Variabilität der Zellkulturen hinsichtlich der Zellart und des Kultivierungsverfahrens richtig

auszunutzen und damit den optimalen Einsatz mit maximalem Erkenntnisgewinn und geringstem Sicherheitsrisiko zu bestimmen (siehe Abbildung 1-1).

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur oben beschriebenen Problematik leisten und hat die Aufgabe, den Erkenntnisstand über in vitro-Testsysteme für Biotransformations-untersuchungen zu erweitern. Die Zielstellung ist dabei, die humane Hepatomzelllinie Hep G2 hinsichtlich ihrer Eignung für diese Fragestellung zu charakterisieren. Neben den Studien zum Fremdstoffmetabolismus sind Testungen zur Proliferation und Zytotoxizität vorgenommen worden. Im einzelnen ergeben sich folgende Schwerpunkte:

- Isolations- und Kultivierungsmethoden für die in vitro-Testsysteme Hepatozyten und Lymphozyten der Wistar-Ratte sowie der Zelllinie Hep G2 werden vorgestellt.
- Die Biotransformationskapazität der Hep G2-Zellen wird mit Hilfe von Indikatorreaktionen charakterisiert. Dabei werden solche Reaktionen herangezogen, die die Aktivität relevanter Isoenzyme für Biotransformationsprozesse repräsentieren. Im Mittelpunkt steht das Schlüsselenzym Cytochrom P450, von dem wichtige Isoenzyme bestimmt werden. Daneben werden Glucuronidierung und Sulfatierung als Phase II-Reaktionen untersucht. Darüber hinaus erfolgt die Bestimmung des Einflusses von Induktoren auf die Aktivität der Zellen. Die Ergebnisse werden mit Studien an Hepatozytenkulturen verglichen. Ergänzend zu beiden Zellarten werden einige Untersuchungen an Lymphozyten vorgestellt.
- Über die subzelluläre Verteilung der Enzymaktivitäten in der Hep G2-Zelle ist bisher wenig bekannt. Daher werden entsprechende Isoenzyme in verschiedenen Zellorganellen charakterisiert.
- Nach biochemischer Charakterisierung erfolgt der Einsatz der Hep G2-Zellkultur bei der Untersuchung der Biotransformation von drei potentiellen Arzneistoffen. Bei den Wirkstoffen handelt es sich um das Immunstimulans AWD 100-041 (3-(2-Mercaptoethyl)chinazolin-2,4(1H, 3H)-dion), das herzwirksame Trepidil (Rocornal®)-Derivat AR 12463 (5-Piperidino-7-[N-pentyl-N(β-hydroxyethyl)]amino-s-triazolo[1,5a]-pyrimidin) und den Lipoxygenasehemmer FLM 5011 (2-Hydroxy-5-methylauropheon-oxim). Diese Wirkstoffe wurden deshalb ausgewählt, weil ihre Biotransformation in vivo an der Ratte und in vitro an Rattenhepatozytenkulturen vollständig aufgeklärt wurde und damit ein Vergleich möglich ist.
- Es werden Testungen zur Proliferation und Zytotoxizität der Hep G2-Zelle vorgenommen. Dabei wird der Einfluß der Wirkstoffe AWD 100-041, AR 12463 und FLM 5011 untersucht. Im Rahmen eines Drittmittelprojektes wurde die Kultur für Untersuchungen der Beeinflussung der Proliferation durch das Mazerat des Krautes von *Solanum lycopersicon* herangezogen. Für einige andere Substanzen, die im Rahmen der Kultivierung und Inkubation eingesetzt wurden, wie Induktoren und Lösungsmittel, werden entsprechende Ergebnisse gezeigt und

ausgewertet.

- Im Rahmen der Untersuchungen zur Zytotoxizität erfolgt eine Bestimmung von apoptotischen Vorgängen und deren Beeinflussung durch den Wirkstoff FLM 5011.

Insgesamt werden aus der Arbeit Aussagen abgeleitet, inwieweit Hep G2-Zellkulturen als Ersatz- und Ergänzungsmethode zu Hepatozytenkulturen oder sogar zu Tierversuchen einsetzbar sind.

2 Charakterisierung der verwendeten in-vitro-Testsysteme

2.1 Die Zellkulturen

2.1.1 Die Hep G2-Kultur

Die humane Zelllinie Hep G2 wurde 1979 von Aden et al. [1] aus einer Leberbiopsie eines Kindes, das an einem primären Hepatoblastom erkrankt war, isoliert. Diese Zelllinie besitzt noch viele Funktionen, die für normale humane Hepatozyten typisch sind. In Kultur sezernieren Hep G2-Zellen die meisten Plasmaproteine, wie z.B. Albumin, Fibrinogen, α -Fetoprotein und Apolipoproteine in das Medium [52]. Hep G2-Zellen besitzen des weiteren die Fähigkeit Glykogen zu bilden, wenn genügend Glucose im Kulturmedium vorhanden ist, und produzieren Collagen I, III und IV [12]. Viele Untersuchungen mit Hep G2-Zellen beschäftigten sich mit Synthese, Sekretion, Abbau und Regulation von Lipoproteinen und ihren Apolipoproteinen [z.B. 16, 30] und haben damit die Bedeutung dieser Zelllinie etabliert.

2.1.1.1 Morphologie

Unter dem Lichtmikroskop (siehe Abbildung 2-1) erscheinen Hep G2-Zellen als flache, polygonal wachsende Zellen mit einer Größe von 12-19 μ m. Sie wachsen größtenteils, aber nicht ausschließlich als Monolayer. Im Zellrasen zeigen Hep G2-Zellen epitheloides Wachstum, das am Rand unregelmäßiger und aufgebläht erscheint. Zellen, die sich vom Zellverband gelöst haben, wachsen gelegentlich auch fibroblastenartig. Bei längeren Kultivierungszeiten kommt es zu einem dreidimensionalen Wachstum. In den Zellhaufen sind die interzellulären Verbindungen sehr intensiv, so daß eine Dissoziation mit Trypsin erschwert war.

Die morphologische Gestalt von Hep G2-Zellen ist denen von humanen Hepatozyten in Kultur sehr ähnlich [5]. Im Gegensatz zu Hepatozyten des Menschen oder der Ratte besitzen sie einen sehr großen Nukleus von 8-12 μ m. Gelegentlich konnten große Vakuolen, von denen einige nach Anfärben mit Ölrot als Lipidtropfen identifiziert werden konnten, im Zytoplasma beobachtet werden [12].

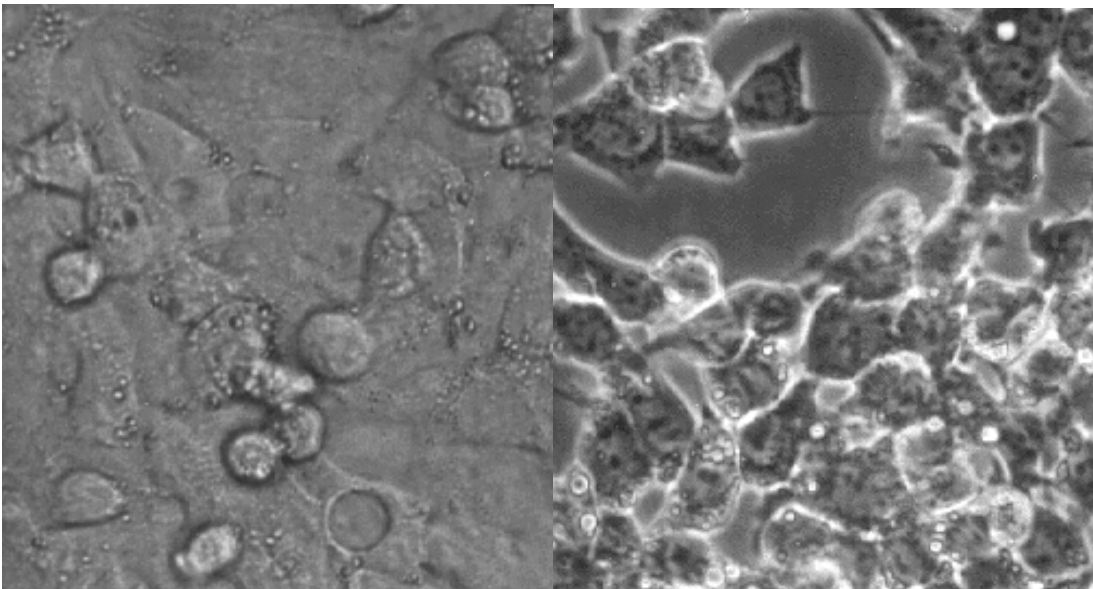


Abbildung 2-1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen einer Hep G2-Kultur bei 100-facher Vergrößerung. Links: Interferenz-Phasenkontrastaufnahme, rechts: Phasenkontrastaufnahme

Gallenkanäle, auf beiden Seiten durch tight junctions abgeschlossen und mit langen Mikrovilli versehen, konnten von Bouma et al. [12] durch Elektronenmikroskopie bei 20000-fachen und 37000-fachen Vergrößerungen gefunden werden. Das rauhe endoplasmatische Retikulum (RER) und der Golgi Apparat mit mehreren Dictyosomen konnten auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut erkannt werden. Der Zellkern (K), Mitochondrien (M), Lysosomen, zwei Desmosomen (D), große Vakuolen (V) und Lipidtropfen (L) konnten ebenfalls identifiziert werden (siehe Abbildung 2-2), nicht aber Peroxysomen [12].

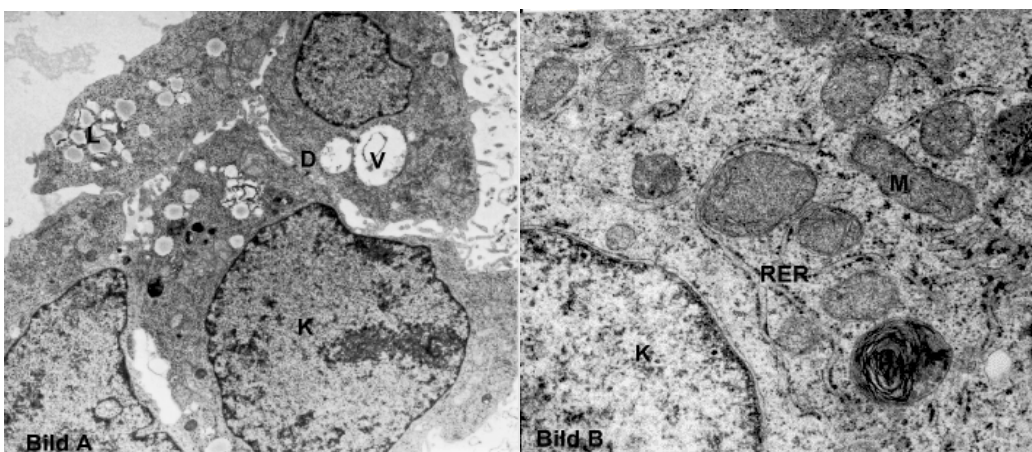


Abbildung 2-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hep G2-Zellen
Bild A: 4400-fache Vergrößerung, Bild B: 20000-fache Vergrößerung

2.1.1.2 Kultivierung

Die Kultivierung der Hep G2-Zellen erfolgte als Monolayer in Polystyren-Kulturgefäßen. Daher kamen 25cm²- und 75cm²-Kulturflaschen, sowie 24well-Multischalen und 96well-Mikrotiterplatten zur Anwendung.

Eine Beschichtung mit Kollagen war für die Anheftung und die Kultivierung der Zellen nicht erforderlich, führte aber zu einer geringen Steigerung der Cytochrom P450-Aktivität (siehe 2.3.1.1).

Das Kulturmedium bestand aus einer Mischung von RPMI 1640 und Medium 199. RPMI 1640 ist ein komplexes Medium, das auch oft für die Kultivierung von Hepatozyten der Ratte und des Menschen eingesetzt wurde [7]. Es ist ein Calcium-armes Medium (0,625mM) mit Glucose als Hauptkohlenstoffquelle. Medium 199 enthält noch einige Komponenten, die in RPMI 1640 nicht enthalten sind. Dazu gehören einige Vitamine, wie L-Ascorbinsäure, Calciferol, Nicotinsäure, DL- α -Tocopherolphosphat und Vitamin-A-acetat. Des weiteren enthält Medium 199 noch ein Eisensalz und Purin- bzw. Pyrimidinbasen sowie D-Ribose und Desoxyribose.

Der Zusatz von nicht essentiellen Aminosäuren zu den schon im Medium enthaltenden essentiellen Aminosäuren erwies sich als vorteilhaft. Nicht essentielle Aminosäuren werden zwar von den Zellen produziert, werden dann aber in das Kulturmedium abgegeben und stehen somit den Zellen nicht mehr in ausreichender Konzentration zur Verfügung. Die Erhöhung des Aminosäuregehalts im Kulturmedium sorgt deshalb für eine ausgewogene Stickstoffbilanz und eine hohe Proteinsynthese [7]. Vor allem der Zusatz von L-Glutamin beeinflusst stark die Wachstumsrate, denn Glutamin wird neben Glucose von vielen Zellen als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt. Hierbei wurden 4mM L-Glutamin dem Medium zugesetzt.

Als weitere Energiequelle wurde 1mM Natriumpyruvat zugesetzt. Dies kann zu Laktat oder Acetoacetat und schließlich nach Durchlaufen des Zitronensäurezyklus zu CO₂ abgebaut werden und unterhält damit die endogene CO₂-Produktion [34]. Zusätzlich wird die Proteinsynthese angeregt [7]. NaHCO₃ ist sowohl Puffersubstanz als auch essentieller Nahrungsbestandteil. Bei starkem Wachstum treten erhöhte CO₂-Werte auf, die den pH-Wert erniedrigen. Der Abfall des pH-Wertes kann durch NaHCO₃-Zusatz neutralisiert werden [65].

Ein Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) ist für viele Zelllinien notwendig. Hep G2-Zellen wachsen sowohl bei 5% als auch bei 10% FKS gut, wobei bei 5% FKS wesentlich geringere Enzymaktivitäten beobachtet werden konnten [25]. In FKS sind viele Komponenten enthalten, die das Wachstum von Zellen stark beeinflussen. Proteine, wie Albumin und Globuline, sind die Hauptbestandteile des Serum. Proteine, wie Fibronectin und Fetuin fördern die Zellanheftung an das Substrat, während α_2 -Makroglobulin Trypsin hemmt und deshalb nach einer Passage mit Trypsin für die Regeneration der Zellen von Bedeutung ist. Da viele transformierte Zellen eher geringe Mengen an Fibronectin produzieren, ist es notwendig, Fibronectin dem Kulturmedium

zuzusetzen. Kulturmedien, die 10% fetales Kälberserum enthalten, haben eine Fibronektinkonzentration von 2-3µg/ml [80].

In FKS sind diverse Wachstumsfaktoren enthalten, die einen Einfluß auf das Wachstum und die Differenzierung haben. Dazu gehört z.B. PDGF (platelet-derived growth factor), ein dimeres Polypeptid, das Zellmigration und Zellproliferation induziert. Die in FKS ebenfalls enthaltenen Peptide der Familie der EGF (epidermal growth factor) und der FGF (fibroblast growth factor) sind an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt [42]. In geringen Mengen sind auch Hormone wie Insulin zur Förderung der Glucose- und Aminosäureaufnahme in die Zelle und Hydrocortison, welches an der Regulation von Adhäsion und Proliferation beteiligt ist, im FKS vorhanden. Auch die Spurenelemente Eisen, Kupfer und Zink, die an Serumprotein gebunden sind, werden von FKS bereitgestellt [34].

Die Hitzeinaktivierung von fetalem Kälberserum bei 56°C für 30min soll störende Einflüsse verschiedenster Art beseitigen. Dazu gehört z.B. die Laktatdehydrogenase, deren Zerstörung vor allem dann vorteilhaft sein kann, wenn der Gehalt der LDH im Zellkulturüberstand als Maß für die Schädigung der Zellen gemessen werden soll [65]. Auch Viren und Mykoplasmen werden zerstört. Allerdings ist mit einem großen Verlust an Vitaminen und Wachstumsfaktoren zu rechnen, der andererseits das Wachstum der Zellen negativ beeinflusst. Deshalb wurde auf eine Hitzeinaktivierung des Serums verzichtet.

Der Zusatz einer Penicillin/Streptomycin-Mischung erwies sich trotz der Gefahr einer Resistenzbildung und eines negativen Einflusses auf die Proliferation als vorteilhaft, um Verluste an Zellmaterial zu vermeiden. Konzentrationen von 280µM Penicillin und 70µM Streptomycin haben keinen Effekt auf die Zellintegrität und nur eine geringe Auswirkung auf die Proteinsynthese [7].

Um die Wachstumsgeschwindigkeit zu bestimmen wurde eine Wachstumskurve von Hep G2-Zellen erstellt. Da bei den Modellreaktionen für die fremdstoffmetabolische Charakterisierung (siehe 2.3) innerhalb der Inkubationszeiten von 72h kein Mediumwechsel erfolgte, wurden die Wachstumskurven sowohl mit Mediumwechsel als auch ohne Mediumwechsel ermittelt (siehe Abbildung 2-3).

Hierzu wurden 10^5 Zellen eingesät. Davon hefteten sich aber auf Grund von Zellschädigungen durch Trypsin oder mechanische Reizungen nur $0,87 \times 10^5$ Zellen an. Dies entspricht einem Verlust von 13%. Nach 4h fand in allen Kulturen ein Mediumwechsel statt. Anschließend wurden einige Kulturen ohne weiteren Wechsel des Mediums kultiviert, die anderen Kulturen bekamen nach jeweils 24h frisches Medium.

Die Ausgangszellzahl wurde nach Einsetzen des Wachstums der Zellen nach 24h wieder erreicht. In Kulturen, bei denen kein Mediumwechsel vorgenommen wurde, war die logarithmische Wachstumsphase sehr kurz und nach 48h blieb die Zellzahl fast stabil. Eine Kultivierung über 72h ohne Mediumwechsel führte zwar nicht zu einem Nährstoffmangel, der ein Absterben von Zellen induzierte, verlangsamte aber das Wachstum und war damit trotzdem für die

Durchführung der fremdstoffmetabolischen Charakterisierung mittels Modellreaktionen (siehe 2.3) geeignet. Kulturen, bei denen alle 24h ein Mediumwechsel vorgenommen wurde, zeigten nach 48h eine wesentlich stärkere Proliferation. Diese Form der Kultivierung ist daher für die schnelle Anzucht von Hep G2-Zellen von Vorteil.

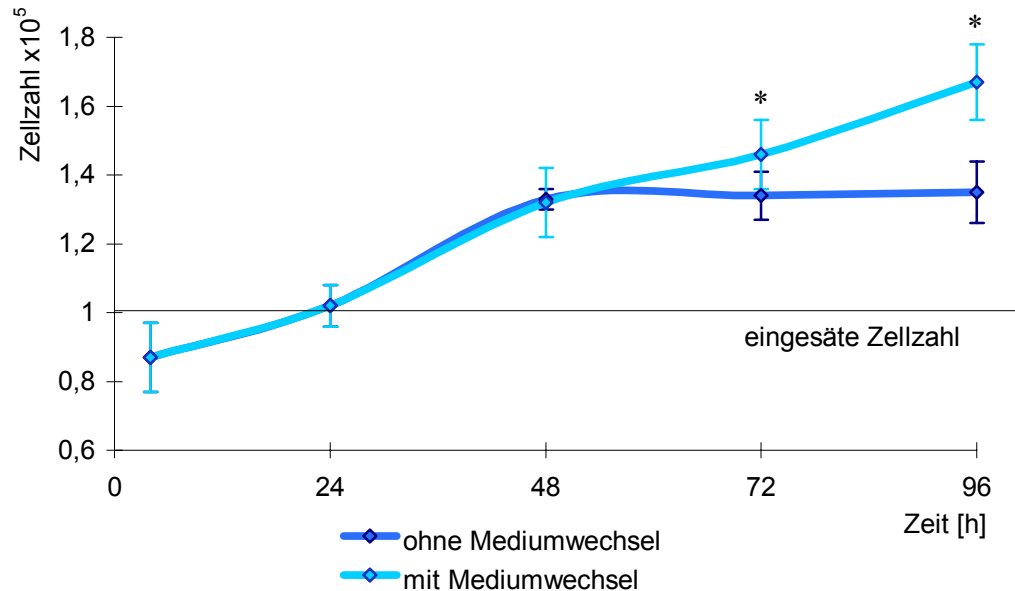


Abbildung 2-3: Wachstumskurve von Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$, $^* \alpha < 0,05$

Die Verwendung von Microcarrier bietet den Vorteil der Gewinnung von großen Mengen an Zellmaterial. Monolayerkulturen auf Microcarrier haben eine maximale Kulturfläche im Verhältnis zum Kulturmediumvolumen. Ein weiterer Vorteil ist die relativ einfache Handhabung, die der Suspensionskultur ähnlich ist. Nachteilig ist die schwierige Zellzählung, weshalb ihr häufig eine Protein- oder DNA-Bestimmung vorgezogen wird. Da die Zellen auch hier an einer Grenze zwischen Fest- und Flüssigphase wachsen, ist das Mikroskopieren möglich.

Microcarrier können aus Polystyren, Sephadex oder Polyacrylamid bestehen und mit Kollagen oder Gelatine beschichtet sein [34]. Die hierbei benutzten Cytodex[®] 3 Microcarrier bestehen aus einer quervernetzten Dextranmatrix, an die denaturiertes Kollagen I kovalent gebunden ist. Dabei soll die Beschichtung mit Kollagen die Anheftung der Zellen durch bevorzugtes Binden von Fibronectin an denaturiertes Kollagen beschleunigen [80].

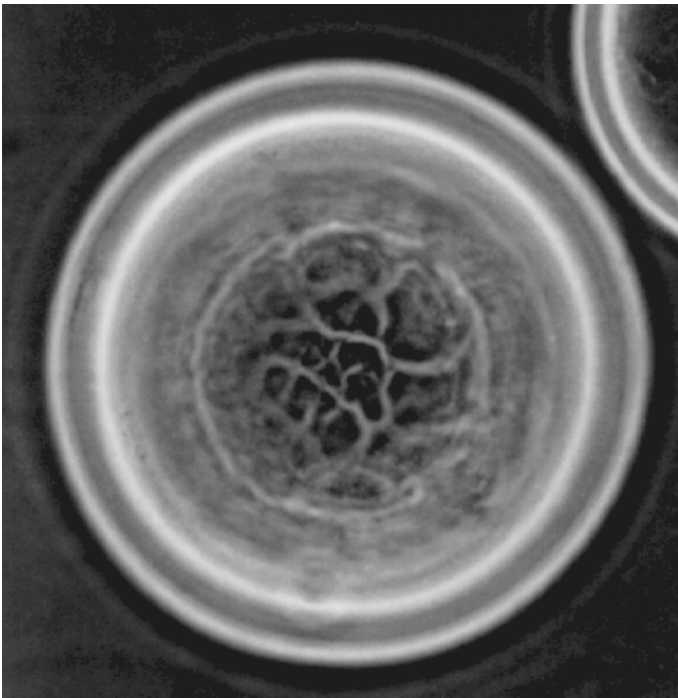


Abbildung 2-4: Hep G2-Zellen kultiviert auf Cytodex[®], 40-fache Vergrößerung

Hierbei wurden Microcarrier eingesetzt, um den Effekt der Kultivierung auf Kollagen auf die Biotransformation zu untersuchen (siehe 2.3.1.1).

2.1.2 Die Hepatozytenkultur

Die Leber ist das größte zentrale Stoffwechselorgan des Intermediärstoffwechsels im Organismus und übernimmt wichtige Funktionen bei der Entgiftung, Inaktivierung und Ausscheidung körpereigener und körperfremder Substanzen. Sie ist weiterhin die größte exokrine Drüse, was sich durch die Bildung und Ausscheidung der Galle darstellt. Die Leber, die unter der rechten Zwerchfellkuppel liegt, wird zu etwa 75% durch die Pfortader mit venösem Blut aus Magen, Dünndarm, Dickdarm, Teilen des Mastdarms, Bauchspeicheldrüse und Milz versorgt. Die arterielle Versorgung über die Leberarterie deckt nur 25% des Blutbedarfs. Das Blut gelangt über die Kapillaren der Leber in Venen und wird über die untere Hohlvene abgeführt. Die Bauelemente der Leber sind die nahezu sechseckigen Leberläppchen, die durch Bindegewebszüge voneinander getrennt sind. Da, wo mehrere Läppchen zusammenstoßen und sich Bindegewebszwickel bilden, die periportale Felder genannt werden, verlaufen die Äste der Pfortader. Die Wände der Leberkapillaren, den so genannten Sinusoiden, bestehen aus zwei Zelltypen: den Endothelzellen und den zum retikuloendothelialen System zugehörigen Kupfferschen-Sternzellen. Letztere können Zelltrümmer, Bakterien und Fremdstoffe aufnehmen und speichern und sind wahrscheinlich auch am Abbau von Erythrozyten beteiligt. Zwischen der

Wand der Lebersinusoide und den Hepatozyten ist ein Spalt, der Disséscher Raum genannt wird. In diesen reichen die zahlreichen Mikrovilli der Hepatozyten und können so direkten Kontakt mit Stoffen, die aus der Kapillarwand getreten sind, aufnehmen [107]. Die Hepatozyten repräsentieren 60-65% der Zellen der Leber. Da sie wesentlich größer sind als die Nichtparenchymzellen, nehmen sie über 80% des Volumens der Leber ein. Weitere Zell-typen der Leber sind die für die Fett- und Vitamin-A-Speicherung zuständigen Ito-Zellen, die Pit-Zellen, denen endokrine Funktionen zugeschrieben werden, und die schon genannten Endothelzellen und Kupfferschen-Sternzellen.

Jeder Hepatozyt ist mit mehreren Nachbarzellen eng verbunden über *tight*, *intermediate* und *gap junctions*, sowie über Desmosomen. Gallenkanäle mit Mikrovilli werden zwischen den Hepatozyten ausgebildet. Während der Isolation von Hepatozyten werden die Zellkontaktstrukturen endozytiert, können aber bei Kultivierung der Zellen als Monolayer erneut gebildet werden [7].

2.1.2.1 Isolation der Hepatozyten

Die Isolation der Hepatozyten aus der Rattenleber erfolgte anhand der Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik nach Seglen et al. [93]. Dabei wird die Leber zuerst mit einem größeren Volumen Calcium-freien Mediums entblutet und erst dann wird der enzymatische Gewebeaufschluß begonnen. Durch die Perfusion mit großen Volumina Calcium-freien Mediums werden Calcium-Ionen von den Desmosomen eluiert, was dann zu einer großen Zellausbeute mit geringer Zellschädigung führt. Daß bei dem Kollagenase-haltigen Perfusionsmedium wieder Calcium zugeführt wird, hat nicht nur Auswirkungen auf die Kollagenaseaktivität, sondern hat ebenfalls den Zweck, Hepatozyten die Möglichkeit des Ausgleiches von anormalen Ionenverteilungen zu geben.

Mit 0,05% Kollagenase können gute Ergebnisse erzielt werden. Geringere Konzentrationen führen nicht zu weniger geschädigten Zellen. Der Zusatz von Heparin zum Kulturmedium ist nicht notwendig, da die Leber schnell entblutet wird und dadurch eine relativ geringe Gefahr der Thrombenbildung besteht. Auch der Zusatz eines Chelatbildners um eine komplette Calcium-Elution zu erreichen, führt nicht zu einer höheren Ausbeute [7]. Um einen stabilen pH zu erhalten wurde das Perfusionsmedium mit 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure (HEPES) gepuffert.

Die Perfusion wurde erst abgebrochen, wenn die Leber sich durch leichten Druck irreversibel verformte. Da dies stark von der Qualität der Kollagenase abhängt, konnte der zweite Schritt von unterschiedlicher Dauer sein. Ein leichtes Anschwellen der Leber am Anfang der Perfusion durch Unterbrechen des Ausflusses, sollte die Zellausbeute erhöhen. Allerdings steigt bei zu starker Schwellung oder zu hohem Perfusionsdruck schnell die Anzahl an geschädigten Zellen

[7].

Das Waschen der Zellen mit 0-4°C gekühltem Medium führt zwar zu einem Kalium-Verlust in der Zelle und zu einem Einstrom von Natrium-Ionen, aber dies scheint reversibel zu sein. Außerdem ist der Verlust an Enzymen wesentlich größer, wenn bei Raumtemperatur gewaschen werden würde [7]. Das Waschen verringert den ungewollten Anteil an Kupfferschen-Sternzellen, Fibroblasten und Endothelzellen [65].

Nach Waschen und Suspendieren der Zellen in Kulturmedium, wurde die Vitalität der Zellen mit Trypanblau getestet. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion vorwiegend an Proteine bindet. Bei lebenden, vitalen Zellen kann Trypanblau nicht in das Zellinnere gelangen, während tote Zellen sich anfärben lassen und dann unter dem Mikroskop blau erscheinen. Der Farbstoffausschluß wird darauf zurückgeführt, daß bei der nicht geschädigten Zelle das Plasmamembranpotential unter Energieaufwand erhalten bleibt, wobei die zytoplasmatische Seite negativ geladen ist. Ein Verlust des Potentials erlaubt ein Eindringen von negativ geladenem Trypanblau. Allerdings ist die Farbstoffaufnahme stark pH-abhängig, so daß darauf zu achten ist, daß der pH nicht unter 7 sinkt, da sonst auch vitale Zellen angefärbt werden. Trypanblau ist prinzipiell zytotoxisch, weshalb die Zellen sofort beobachtet werden müssen, da der Anteil an gefärbten Zellen mit der Zeit zunimmt [65]. Abbildung 2-5 zeigt die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Hepatozyten im Überblick [57]. Im Unterschied zu transformierten Zellen, z.B. Hep G2-Zellen, ist der Zellkern wesentlich kleiner.

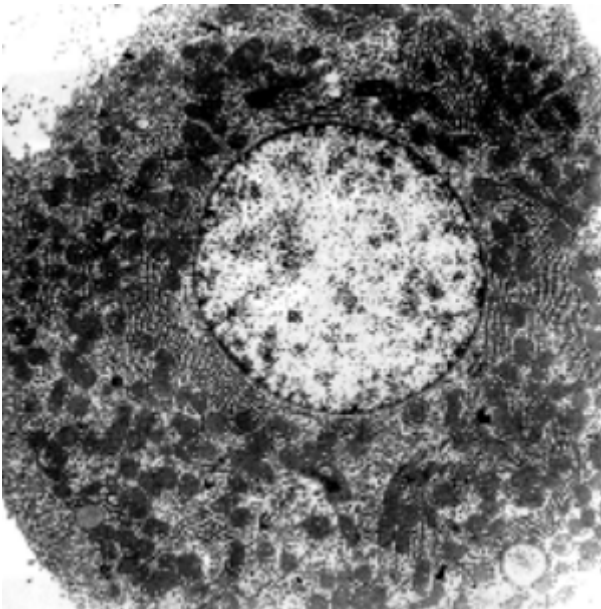


Abbildung 2-5: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Hepatozyten der Wistar-Ratte

2.1.2.2 Kultivierung

Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte ebenfalls als Monolayer. Um mit begrenzten Mengen an Hepatozyten arbeiten zu können und damit den Verbrauch an Versuchstieren gering zu halten, wurden bevorzugt 24well-Multischalen zur Kultivierung eingesetzt.

Hepatozyten heften sich nur sehr schlecht an Polystyren-Kulturgefäße. Doch scheint die Adhäsion an ein Substrat und die damit verbundenen Änderungen in der Zellform und der Organisation des Zytoskeletts einen großen Einfluß auf die Proteinsynthese und den Erhalt leberspezifischer Funktionen zu haben. Hepatozyten heften sich gut an alle Sorten von Kollagen, obwohl sie eine besonders hohe Affinität zu Kollagen IV haben. Kollagen I ist das am meisten genutzte Kollagen, da es leicht zu gewinnen und billig ist. Es bildet einen gelartigen Film, auf denen sich Hepatozyten schnell und am Anfang mit wenig abgeflachter Form anheften. Eine hohe Zelldichte ($1-2 \times 10^5$ Zellen/cm²) und große Kulturmedienvolumina fördern zusätzlich die Anheftung der Hepatozyten an das Substrat [7].

Der Zusatz von Insulin zum Kulturmedium verbessert nicht nur das Anheftungsverhalten der Hepatozyten, sondern erhöht ebenfalls die Proteinsynthese und die Albuminsekretion. Auch sollen leberspezifische Funktionen besser erhalten bleiben, besonders wenn dem Medium noch das Glucocorticoid Dexamethason zugesetzt wird. Der Zusatz von Phenobarbital, vor allem im Zusammenhang mit Insulin und Dexamethason, führt zu einem längeren Erhalt der typischen Zellmorphologie. Es kommt aber auch zu einer Induktion von Cytochrom P450-Isoenzymen und einer Stimulation der DNA-Synthese, wobei letztere stark von der Konzentration abhängt, denn bei hohen Phenobarbitalkonzentrationen kommt es zu einer Inhibition der DNA-Synthese. Darüber hinaus wird ein Herabsetzen des oxidativen Stresses durch Phenobarbital diskutiert [7]. Konzentrationen von Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu 2% erhalten lange einen differenzierten Zustand der Hepatozyten in Kultur. Die DNA-Synthese wird blockiert und die Zellen bleiben über Wochen mit spezifischen Funktionen erhalten. Da aber für 2% DMSO ein negativer Einfluß auf die Membranintegrität von Hep G2-Zellen gezeigt werden konnte (siehe 4.1.2.8), wurde hier auf die Zufuhr hoher DMSO-Konzentrationen verzichtet.

Der Erhalt von Cytochrom P450-Aktivitäten kann auch durch Zusatz von Nicotinamid gewährleistet werden. Dies kommt wahrscheinlich nicht durch Induktion, sondern durch Inhibition des Abbaus bestimmter Isoenzyme zustande. Im Kulturmedium sind ca. 0,8mg/l Nicotinamid enthalten [7].

Kurz nach der Aussaat zeigten die Hepatozyten auf Kollagen eine eher kugelige Form. Tote oder geschädigte Zellen behielten die Kugelform bei und saßen oft auf dem gesunden Zellrasen. Nach spätestens 48h waren dann alle vitalen Zellen ganz abgeflacht und zeigen eine eher hexagonale Form. Dies ist in Abbildung 2-6 zu sehen.

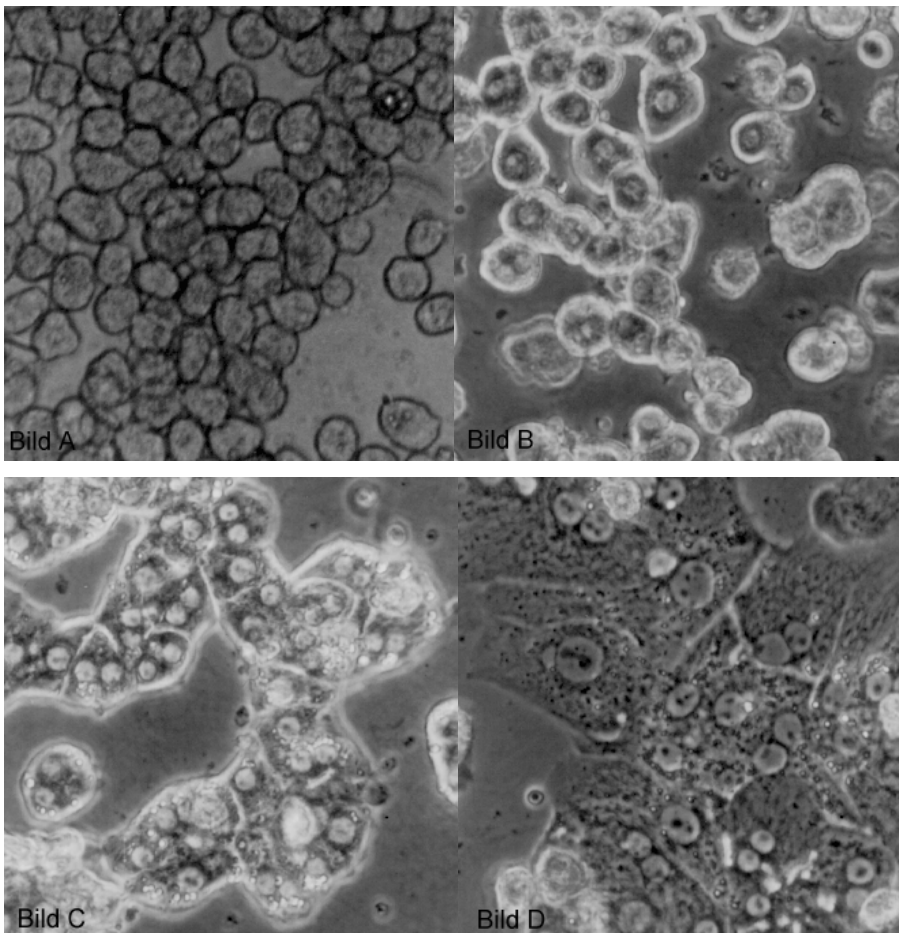


Abbildung 2-6: Monolayerkultur von Hepatozyten, 40-fache Vergrößerung

Bild A: wenige Minuten nach der Aussaat, Bild B: nach 6h, Bild C: nach 24h,

Bild D: nach 72h, Bild B-D: Phasenkontrastaufnahmen

2.1.3 Die Lymphozytenkultur

Lymphozyten machen 20% der Gesamtheit der Leukozyten aus. Sie können in B- und T-Lymphozyten, sowie in sogenannte Nullzellen oder NonT-NonB-Zellen, die keine für Lymphozyten charakteristischen Oberflächenantigene besitzen, unterteilt werden. Alle Lymphozyten stammen von lymphoiden Vorläuferzellen ab. T-Zellen werden im Thymus, B-Zellen in der fetalen Leber sowie im Knochenmark und Nullzellen nur im Knochenmark gebildet. Nach ihrer Bildung wandern die Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Gewebe über die Blutbahn und die Lymphe aus. Morphologisch werden zwei Arten von Lymphozyten unterschieden: die kleinen Lymphozyten, die keine Granula besitzen und ein hohes Kern-Plasma-Verhältnis haben und die großen Lymphozyten, die azurophile Granula besitzen und ein niedriges Kern-Plasma-Verhältnis haben. Letztere sind meistens T-Lymphozyten [84].

2.1.3.1 Isolation

Lymphozyten kommen im Blut und in den immunkompetenten Organen Tonsillen, Lymphknoten und Milz vor. Sie können sowohl aus dem Blut als auch aus der Milz gewonnen werden, wobei die Ausbeute bei der Gewinnung aus der Milz größer ist. Die aus der Milz gewonnenen Zellen, auch Splenozyten genannt, bestehen aus 60-80% Lymphozyten, wovon 40-50% B- und 50-60% T-Lymphozyten sind. Der Rest setzt sich aus Makrophagen, Monozyten, Erythrozyten, Retikulum- und Endothelzellen zusammen. In der Milz befinden sich die Lymphozyten vor allem in der weißen Pulpa. Die dort befindliche periarterioläre lymphatische Scheide besteht aus T- und B-Zell-Arealen. Diese Lymphzell-ansammlungen enthalten im Keim- und Entwicklungszentrum Entwicklungsstufen der B-Lymphozytenreihe. Unmittelbar um die Zentralarteriole befinden sich die Entwicklungsstufen der T-Zellen. Der Abfluß der Lymphozyten erfolgt über die lymphatische Scheide.

T- und B-Lymphozyten sind über die Zentralarteriolen mit der Marginalzone, die weiße und rote Pulpa voneinander trennt, verbunden. Diese enthält sowohl T- als auch B-Lymphozyten. Reifende Plasmablasten können die Marginalzone überqueren und in die rote Pulpa gelangen, die hauptsächlich zum Abbau von verbrauchten Erythrozyten zuständig ist [84].

Die aus der Milz isolierten Lymphozyten sind im Gegensatz zu aus Blut oder Thymus isolierten Lymphozyten ausschließlich reife B- und T-Lymphozyten. Reife B-Lymphozyten sind für die Regulation der humoralen Immunantwort, reife T-Lymphozyten für die der zellvermittelten Immunantwort verantwortlich [40].

Aus der Zellsuspension, die aus der Milz durch Zerkleinern oder Ausdrücken gewonnen werden kann [85], lassen sich Lymphozyten leicht durch Zentrifugation über einer Schicht aus Polysucrose-Natriumditrizoat-Lösung (Histopaque® 1077) abtrennen. Nach Zentrifugation befinden sich die meisten Lymphozyten in der Grenzschicht und nur einige Blutplättchen oder Monozyten verunreinigen diese. Erythrozyten und Granulozyten befinden sich hauptsächlich im Polysucrose-Natriumditrizoat-Gemisch oder sedimentieren zu einem Pellet. Aus einer Milz konnten nahezu 10^7 Lymphozyten gewonnen werden. Trotz des mechanischen Zellaufschlusses der Milz scheint dieses Verfahren ein sehr schonendes zu sein, denn die Vitalität der Lymphozyten, getestet durch Trypanblau-Ausschluß, betrug immer über 90%.

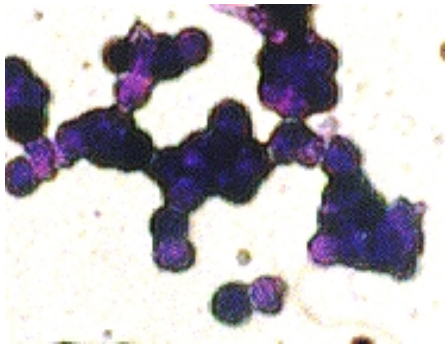


Abbildung 2-7: Lymphozyten nach Isolation angefärbt mit May-Grünwald-Lösung. Die Zellkerne die beinahe 90% der Lymphozyten ausmachen sind stark blauviolett gefärbt. Das Plasma ist schwächer gefärbt.

2.1.3.2 Kultivierung

Die aus der Rattenmilz isolierten Lymphozyten wurden als Suspension kultiviert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 gewählt, welches speziell zur Kultivierung von Lymphozyten und Hybridomzellen entwickelt wurde. Der niedrige Calcium-Gehalt dieses Mediums ist für Suspensionskulturen vorteilhaft. 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure (HEPES) wird in Konzentrationen von 10-50mM verwendet, die nicht toxisch sind. HEPES Zusatz bewirkt vor allem im physiologischen Bereich eine gute Pufferung und pH-Stabilität, auch bei schnell wachsenden Kulturen mit starker Ansäuerung [65]. Mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum zum Medium sind Lymphozyten in Kultur über mehrere Tage vital. Andererseits kann es durch fetales Kälberserum zu einer unspezifischen Stimulation der Lymphozyten kommen [85]. Um allerdings eine Teilung der normalerweise nicht proliferierenden Zellen zu erwirken, ist eine Stimulierung der Zellen mit spezifischen Antigenen oder mit mitogenen Lektinen notwendig [65]. Lektine, also Proteine, die spezifische Kohlenstoffdeterminanten auf der Zelloberfläche binden und quervernetzen, stimulieren lymphatische Zellen polyklonal. Die stimulatorische Wirkung ist also nicht auf eine antigene Funktion zurückzuführen. Lymphozyten existieren normalerweise als ruhende Zellen in der G_0 -Phase, treten aber sofort nach Kontakt mit einem polyklonalen Mitogen in die G_1 -Phase ein und durchlaufen dann den gesamten Zellzyklus. Wie bei der Stimulation durch Antigene differenzieren Lymphozyten zu Gedächtniszellen oder zu Effektorzellen, wobei B-Lymphozyten zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen und T-Lymphozyten zu Lymphokine produzierende und zytotoxisch agierende Zellen werden. Im Gegensatz zur Antigenstimulation werden durch Lektine viele Lymphozytenklone aktiviert, während bei der Antigenstimulation nur die Klone der Lymphozyten aktiviert werden, die die spezifischen Rezeptoren tragen. Doch werden von Lektinen nicht alle Lymphozyten-untergruppen stimuliert sondern nur ca. ein Drittel. Außerdem kommt es zu einer Zunahme des Zellvolumens und des

Zytoplasmas, das wegen des hohen RNA-Anteils basophil ist. Der Zellkern liegt exzentrisch [84]. Für die Wechselwirkung zwischen Lektinen und Zellen sind spezielle Mitogenrezeptoren von Bedeutung. An ihnen sind Kohlenhydrate gebunden, die mit der Bindungsstelle des Lektins interagieren. Die meisten Lektine reagieren mit nur einem einzigen Zucker, z.B. Galaktose. Andere haben eine breitere Spezifität und reagieren mit einer Reihe eng verwandter Zucker oder aber mit komplexen Kohlenhydraten in Glykoproteinen der Zelloberfläche.

Die in der Immunologie am häufigsten eingesetzten mitogenen Lektine sind Concanavalin A, Phythämagglutinin und Pokeweed-Mitogen. Phythämagglutinin, ein Glykoprotein aus *Phaseolus vulgaris*, stimuliert vorzugsweise T-Lymphozyten. Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis* (Schwertbohne) ist ein reines Protein, das an α -D-Mannose- oder an α -D-Glucose-Reste bindet. Concanavalin A besteht aus vier identischen Untereinheiten und bildet spontan in Abhängigkeit vom pH-Wert Dimere oder höhere Aggregate. Jede Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Kohlenhydrate und eine für Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen, die für die Anlagerung an Kohlenhydrate benötigt werden. Concanavalin A aktiviert vor allem T-Lymphozyten. B-Lymphozyten können nur aktiviert werden, wenn eine Quervernetzung der Zucker besteht [51, 84].

2.2 Subzelluläre Fraktionen

Für vertiefende Untersuchungen der fremdstoffmetabolischen Aktivitäten wurden aus Hep G2-Zellen subzelluläre Fraktionen und Zellorganellen gewonnen, um insbesondere die enzymatische Verteilung zu charakterisieren. Die Aktivitäten in Zellorganellen und im Zytosol wurden dabei mit denen im Homogenat, das durch Ultraschallbehandlung gewonnen wurde, verglichen.

Durch geeignete Zellaufschlußverfahren und anschließende differentielle Zentrifugation ist es möglich, einzelne Zellorganellen zu isolieren. Der Einsatz einer Ultraschallbehandlung ist am Anfang der Isolation problematisch, da Zellorganellen zerstört werden können. Mit der Verwendung einer geeigneten Apparatur für den Zellaufschluß, wie z.B. des Potter-Elvehjems, können intakte Organellen erhalten werden. Zur Verhinderung der Autolyse sowie von Inaktivierungs- und Denaturierungsprozessen, die durch Wärmeentwicklung bei dieser Homogenisationstechnik ausgelöst werden können, ist eine ständige Kühlung notwendig. Das entstandene Zellhomogenat kann mit Hilfe der Differentialzentrifugation in einzelne Zellorganellen aufgetrennt werden. Die Zentrifugation bei 600 bis 700g ermöglicht die Abtrennung von Zellkernen und Zelltrümmern. Durch eine anschließende Zentrifugation des entstandenen Überstandes bei 9000g wird die Fraktion der Rohmitochondrien abgetrennt, während Zytosol und Mikrosomen im Überstand bleiben. Dieser Überstand kann nun durch Ultrazentrifugation bei 105000g aufgetrennt werden, wobei die Mikrosomen das Pellet bilden. Die Trennung von Mitochondrien und Lysosomen bzw. Peroxysomen erfolgt durch Zentrifugation im Dichtegradienten. Zur Herstellung solcher Gradienten werden gepufferte

Saccharoselösungen oder Polysaccharide wie Ficoll eingesetzt. Die Zentrifugation wird so lange durchgeführt bis die einzelnen Partikel nicht mehr wandern und sich zu Banden zusammengeschlossen haben. Dies ist der Fall, wenn die Zellkompartimente die Bereiche der Dichte des Gradienten erreicht haben, die ihrer Partikeldichte entsprechen [50].

Von besonderer Bedeutung ist die bei der Homogenisation und Fraktionierung von Zellen aus dem endoplasmatischen Retikulum entstandene Mikrosomenfraktion. In den Mikrosomen ist der größte Teil des Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase-Systems lokalisiert. Viele biotransformatorische Untersuchungen finden deshalb an isolierten Mikrosomen statt. Trotz der vorgeschalteten Aufnahme der Fremdstoffe in die Zelle, wurde für Hepatozyten häufig eine ähnlich hohe Rate an Phase-I-Metabolismus gefunden wie in der Mikrosomenfraktion [7].

Mikrosomen sind nicht in der Lage Phase-II-Metaboliten zu bilden, wenn nicht die entsprechenden Zusätze, wie z.B. UDP-Glucuronsäure für die Glucuronidierung, zum Testansatz hinzugefügt werden. Ohne diese Zusätze käme es zu einer Akkumulation von Phase-I-Metaboliten, welches in intakten Zellen durch den einsetzenden Phase-II-Metabolismus verhindert wird. Dies kann zu Unterschieden der Mengenverhältnisse von Phase-I-Metaboliten in den beiden in-vitro-Systemen führen [7].

2.3 Fremdstoffmetabolische Charakterisierung

Unter fremdstoffmetabolischer Charakterisierung versteht man Reaktionen, die die Umsetzung von bestimmten Substraten durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme repräsentieren. Dies sind Indikatorreaktionen für bestimmte Isoenzyme, die Modellcharakter besitzen. Das für die Biotransformation entscheidende Schlüsselenzym ist die mischfunktionelle Monooxygenase Cytochrom P450.

Das Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase-System spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus exogener aber auch endogener Verbindungen. Cytochrom P450 (CYP)-Isoenzyme sind eine Familie von Hämoproteinen mit einem Thiolat-gebundenem Häm als prostetische Gruppe und einer stark differierenden Apoproteinstruktur, die für die Substratspezifität verantwortlich ist. Sie kommen bei Säugern in Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum vor. Sowohl mikrosomale als auch mitochondriale CYP sind integrale Membranproteine, die durch hydrophobe Wechselwirkungen fest an die Membran gebunden sind. Mikrosomale CYP bilden den größten Teil der Membranproteine im endoplasmatischen Retikulum. Sie bilden in der Membran mit NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und Cytochrom b_5 ein Enzymsystem und katalysieren Oxigenierungsreaktionen. Ihre Synthese erfolgt in den membrangebundenen Ribosomen, wobei sie während dieses Prozesses in die Membran des endoplasmatischen Retikulums eingebaut werden [86].

Die Homologie der cDNA-Sequenz von Ratten- und humanen CYP-Formen liegt im Durchschnitt bei 70-80% [98]. Diese hohe Übereinstimmung kommt durch hoch konservierte Regionen, wie z.B. CYP-Reduktase und das Häm, zustande. Die Änderung einer einzigen Aminosäure kann die CYP-Aktivität jedoch völlig verändern. Dies kann sich als eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Enzymaktivität oder auch als eine Veränderung der Substratspezifität darstellen [64]. Eine Extrapolation von Tier zu Mensch ist deshalb sehr begrenzt. Ferner sind Menschen unterschiedlicher Nahrung oder induzierenden Xenobiotika ausgesetzt, wodurch CYP-Aktivitäten verändert werden können. Zigarettenrauch z.B. erhöht die Aktivität von CYP 1 A1 [98].

In der Zellkultur sind die Aktivitäten von CYP extrem abhängig von der Zusammensetzung des Mediums. Dabei kann es zu Aktivitätsunterschieden bei der CYP 1 A-Familie in Hep G2-Zellen bis zu 5000% kommen. Vor allem der Zusatz von L-Cystein scheint bei der Expression von CYP, aber auch von anderen Enzymen, wie z.B. UDP-Glucuronyltransferasen, eine entscheidende Rolle zu spielen [25]. Das Substrat auf dem die Zellen wachsen z.B. Polystyren, Kollagen oder Matrigel, kann ebenfalls einen Einfluß auf die Enzymaktivitäten haben [7]. Ein weiterer Einfluß auf die Enzymaktivität in Zelllinien ist der Zeitabschnitt des Wachstums der Kultur. Je nach dem, ob ein Experiment 24h nach Aussaat der Zellen, während des exponentiellen Wachstums oder bei Konfluenz gestartet wird, kann zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Bei primären Hepatozytenkulturen verändert sich die CYP-Aktivität während der Dauer der Kultivierung. Vor

allen in den ersten 5 Tage der Kultivierung kann sie erheblich sinken. Die Glucuronidierungsrate zeigt einen geringen Abfall innerhalb der ersten 2 Tage, steigt aber danach stark an. Die Sulfatierung fällt während der ersten 3 Tage stark ab, erreicht bei primären Hepatozyten der Wistar-Ratte aber ihre Ausgangsaktivität wieder [99]. Dies ist bei humanen Hepatozytenkulturen nicht der Fall [53]. Es ist also erforderlich den Zeitpunkt des Versuchsbeginns im Hinblick auf das Alter der Kultur zu standardisieren [24].

2.3.1 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung

Das Phenoxazonderivat 7-Ethoxyresorufin ist ein spezifisches Substrat für CYP 1 A1 und 2 [98]. CYP 1 A2 kommt in der Leber der Ratte konstitutiv vor und kann in allen anderen Geweben wie auch CYP 1 A1 spezifisch induziert werden. Potente Induktoren sind planare Moleküle, die auch bevorzugte Substrate sind, z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie das Karzinogen 3-Methylcholanthren (3-MC) oder planare polyhalogenierte Biphenyle, wie 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) [78].

Die Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin erfolgt durch Angriff des am Cytochrom P450 aktivierten Sauerstoffs am α -C-Atom zum Heteroatom unter Bildung eines Halbacetals, welches wegen seiner geringen Stabilität zu Acetaldehyd [79] und dem stark fluoreszierende Resorufin gespalten wird. Aufgrund seiner Fluoreszenz kann Resorufin direkt im Kulturmedium detektiert und quantifiziert werden. Da eine freie Hydroxylgruppe entsteht, ist damit zu rechnen, daß diese konjugiert wird, weshalb eine Deglucuronidierung und -sulfatierung nötig ist, um die gesamte Umsatzrate zu erfassen.

Neben dem spezifischen Induktor 3-MC wurde auch Phenobarbital (PB) eingesetzt. PB ist weniger spezifisch und führt bei der CYP 2-Familie zur stärksten Induktion [78, 98].

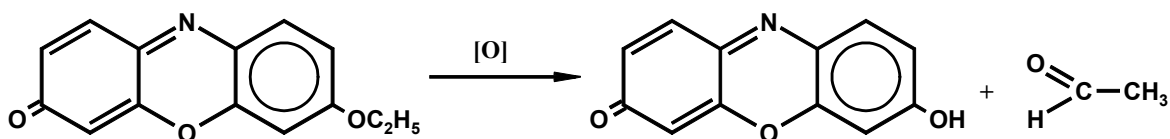


Abbildung 2-8: Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin

Da es sich bei 7-Ethoxyresorufin und allen anderen Substraten der Modellreaktionen um wasserunlösliche Substanzen handelte, wurde anhand der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung auch der Einfluß des Lösungsmittels getestet.

2.3.1.1 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen

Der Umsatz von 7-Ethoxyresorufin durch unbehandelte Hep G2-Zellen während der ersten Stunde entsprach den Werten, die auch von Doostar et al. [25] mit modifiziertem Earl's Medium gefunden wurden. Die Aktivität blieb während 72h annähernd konstant. Um den Einfluß der unterschiedlichen Induktoren auf die CYP-Aktivität in Hep G2-Zellkulturen zu testen, wurden neben unbehandelten Zellen auch mit 3-MC und PB vorbehandelte Zellen auf ihre Aktivität überprüft (Abbildung 2-9).

PB-induzierte Zellen zeigten einen leicht erhöhten Umsatz. Die Induktion mit 3-MC führte jedoch zu einer Umsatzsteigerung von fast 700% über 72h, wobei die Aktivität der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase innerhalb von 72h anstieg. Dies bestätigt die Spezifität sowohl des Induktors als auch des Substrats.

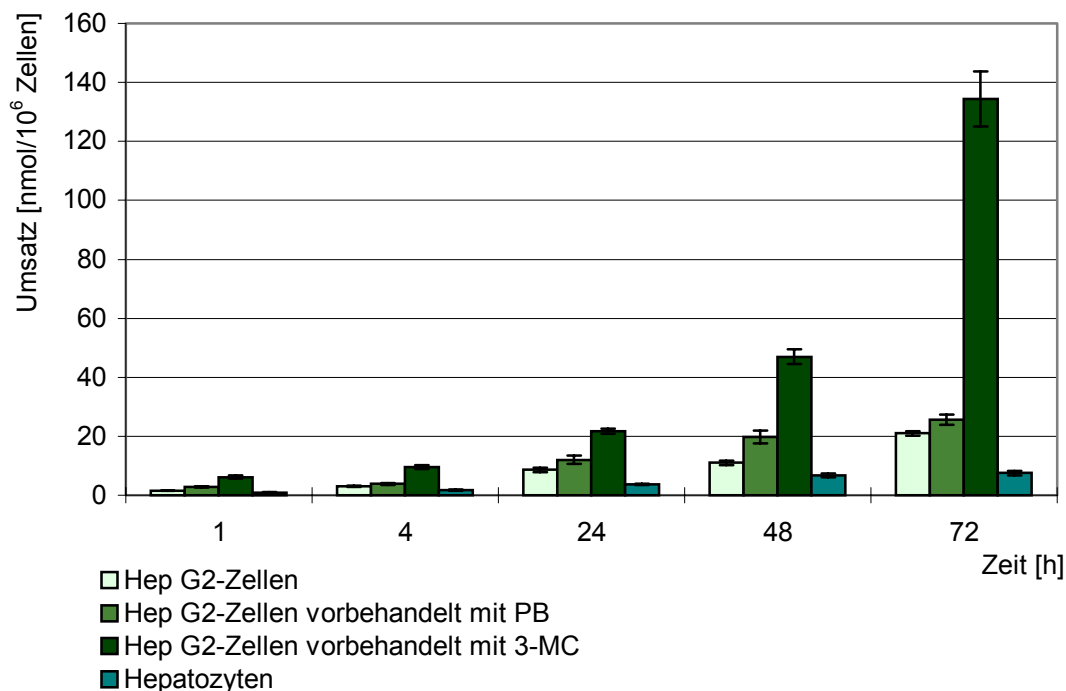


Abbildung 2-9: Umsatz von 7-Ethoxyresorufin durch unbehandelte und mit Induktoren vorbehandelte Hep G2-Zellen, sowie durch Hepatozyten der Wistar-Ratte, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,01$

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Grant et al. [41] beschrieben, wobei für PB keine Aktivitätserhöhung, und für Benz(a)anthracen, ebenfalls ein Induktor von CYP 1 A1 und 2, der weniger toxisch ist und deshalb in höheren Konzentrationen eingesetzt werden konnte, eine über 10-fache Erhöhung innerhalb einer Stunde gefunden wurde. Allerdings war der Umsatz wesentlich geringer als hier beschrieben, was möglicherweise auf ein anderes eingesetztes

Kulturmedium (Dulbecco's modified Eagle's Medium) zurückzuführen sein könnte. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Induzierbarkeit der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung wurde auch von Donato et al. [22] sowohl für Ratten- als auch für humane Hepatozyten gefunden, wobei humane Hepatozyten insgesamt etwas niedrigere Aktivitäten aufwiesen. Durch PB konnte ebenfalls nur eine geringe, für 3-MC aber eine erhebliche Erhöhung der Umsatzrate festgestellt werden.

Die Hepatozytenkultur zeigte hierbei eine wesentlich geringere Aktivität als unbehandelte Hep G2-Kulturen. Nyberg et al. [77] fanden zwar wesentlich geringere CYP 1 A1- und 2-Aktivitäten in Hep G2-Zellen als in Hepatozyten, hier wurde aber das Medium nur mit 5% anstatt mit 10% fetalem Kälberserum versetzt. Dies kann die CYP-Aktivität in Hep G2-Zellen stark verringern [25].

Da die Hepatozyten auf Kollagen kultiviert werden mußten, wurde auch der Einfluß des Substrats auf die Umsatzrate bei Hep G2-Zellen untersucht, da diese für die Versuche auf Polystyren kultiviert wurden. Der Einfluß des Substrats ist in Abbildung 2-10 dargestellt. Hierbei wurde der Einfluß von Kollagen durch den Einsatz von Cytodex® mit normalem Polystyren verglichen.

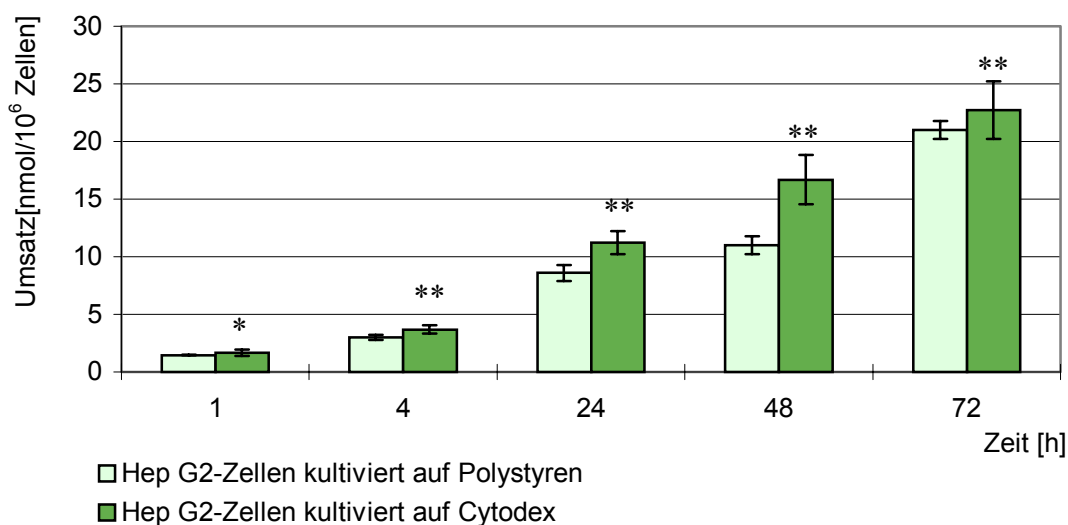


Abbildung 2-10: 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung durch Hep G2-Monolayerkulturen auf Polystyren und Cytodex®, $\bar{x} \pm s$, n=6, * $\alpha < 0,05$ bzw. ** $\alpha < 0,01$

Der Einfluß von Kollagen auf die Enzymaktivität der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase in Hep G2-Zellen war nur gering. Die Umsatzrate der auf Kollagen kultivierten Zellen war ca. 10% höher als die der auf Polystyren kultivierten Hep G2-Zellen. Ferner war die Konjugierungsrate etwas erhöht (siehe Tabelle 2-1).

In Tabelle 2-1 ist der konjugierte Anteil des gebildeten Resurofins dargestellt. Dabei war der

dominierende Faktor die Glucuronidierung. Die Sulfatbildung betrug nur 20% aller Konjugate. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Grant et al. [41], wobei ein Verhältnis von Glucuroniden zu Sulfaten von 5:1 bei Hep G2-Zellen und 4:1 für humane Hepatozyten in Kultur bei 1-Naphthol gefunden wurde (siehe auch 2.3.5.1).

Zeit [h]	Hep G2-Zellen	Hep G2-Zellen kultiviert auf Cytodex®	Hep G2-Zellen induziert mit 3-MC	Hep G2-Zellen induziert mit PB	Hepatozyten der Wistar- Ratte
1	32,5 ± 1,2	37 ± 5,7	63,9 ± 5,7	80 ± 7,3	97,4 ± 2,24
4	41,6 ± 3	52,9 ± 5,4	56,5 ± 3,5	64,5 ± 4,4	98,1 ± 4,5
24	48,8 ± 4,2	51,8 ± 5	65,6 ± 2,8	80,1 ± 9,2	88,6 ± 7,44
48	54,5 ± 3,9	57,2 ± 7,3	65,6 ± 3,6	72,2 ± 7,9	88,3 ± 6,7
72	65,7 ± 2,5	61,5 ± 6,6	75,8 ± 5,3	71,3 ± 4,7	87,5 ± 5,8

Tabelle 2-1: Konjugierungsrate des gebildeten Resorufins in %

Bei induzierten Hep G2-Zellen war der Anteil der Konjugate höher als bei nicht vorbehandelten Hep G2-Zellen. Anscheinend wird Resorufin durch 3-MC- und PB-induzierbare UDP-Glucuronyltransferasen konjugiert. Auch Sulfatasen können durch 3-MC induziert werden (siehe 2.3.5).

Hepatozytenkulturen zeigten eine wesentlich größere prozentuale Konjugationsrate als Hep G2-Zellen, wobei der Anteil der Sulfate an den Konjugaten ein Drittel beträgt [95]. Ein konkreter Vergleich der Aktivitäten ist hierbei aber nicht möglich, da es sich um sehr verschiedene Substratkonzentrationen handelte.

Der Einfluß des Lösungsmittels auf die Umsatzrate von 7-Ethoxyresorufin ist in Tabelle 2-2 abgebildet. Hierbei betrug die Inkubationszeit 24h und die Lösungsmittelkonzentration 0,5%.

Lösungsmittel	DMSO	Ethanol 96%	Methanol	Aceton
Umsatzrate [nmol/10 ⁶ Zellen]	8,6 ± 0,7	4,3 ± 0,36	7,2 ± 0,5	8 ± 0,6

Tabelle 2-2: Einfluß des Lösungsmittels auf die Umsetzung von 7-Ethoxyresorufin durch Hep G2-Zellen

Die höchste Aktivität wurde in Hep G2-Kulturen gefunden, die mit in DMSO gelöstem 7-Ethoxyresorufin versetzt wurden. Methanol und Ethanol verringerten den Umsatz signifikant. Der Zusatz von Aceton führte zwar nur zu einem geringen Abfall der Umsatzrate im Vergleich zu

DMSO-behandelten Zellen, der Unterschied war aber signifikant ($\alpha < 0,05$). Durch die schnelle Verdunstung von Aceton, erwies sich das Pipettieren kleiner Volumina und die Langzeitlagerung der Lösung als problematisch, weshalb Aceton nicht als Lösungsmittel zum Einsatz kam.

DMSO stabilisiert in isolierten Hepatozyten sowohl die CYP-Aktivität als auch die Aktivitäten der Phase-II-Reaktionen [83, 89]. Hierbei wurden Konzentrationen (2%) eingesetzt, die bei Hep G2-Zellen schon eine Freisetzung von Laktatdehydrogenase aus dem Zytosol bewirkten (siehe 4.1.2.8.). Eine Konzentration von weniger als 0,5% führte bei Hep G2-Zellen nicht zu toxischen oder proliferationshemmenden Erscheinungen (siehe 4.1.2.8), weshalb für alle folgenden Versuche DMSO als Lösungsmittel eingesetzt wurde.

Da die Enzymaktivität und damit die Umsatzrate stark von der Substratkonzentration abhängig ist, wurde dies durch Einsatz unterschiedlicher 7-Ethoxyresorufinkonzentrationen untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2-3.

Konzentration [nmol/ml]	Gesamtresorufin [nmol/10 ⁶ Zellen]
1	1,34 ± 0,12
2	2,2 ± 0,11
4	6,7 ± 0,6
8	8,6 ± 0,7
16	11,3 ± 1
24	6,5 ± 1,1

Tabelle 2-3: Umsatzraten von 7-Ethoxyresorufin durch Hep G2-Zellen bei ansteigender Substratkonzentration

Niedrige Substratkonzentrationen führten zu einer geringeren Bildung von Resorufin. Mit steigender Konzentration nahm die Umsatzrate bis zu einer Konzentration von 16nmol/ml zu. Bei 24nmol/ml 7-Ethoxyresorufin zeigten die Hep G2-Zellen toxische Erscheinungen wie Schrumpfungen, fibroblastoide Veränderungen und Ablösungen vom Substrat. Diese durch Zytotoxizität hervorgerufenen Veränderungen erklären auch den starken Abfall des Umsatzes von 7-Ethoxyresorufin, weshalb das Ergebnis nicht bei der Bestimmung des K_m -Wertes mit einbezogen wurde. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit würde, theoretisch über den Lineweaver-Burk-Plot errechnet, bei 39,44nmol/ml Ethoxyresorufin erreicht werden. Dies lag weit im toxischen Bereich und konnte nicht bei Ganzzellen angewendet werden. Der theoretisch errechnete K_m -Wert, also die Konzentration bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit

erreicht wird, lag mit 29,07nmol/ml 7-Ethoxyresorufin auch im toxischen Bereich und konnte ebenfalls nicht für Biotransformationsuntersuchungen an Zellkulturen herangezogen werden. Die eingesetzte Konzentration lag hiermit in einem Bereich, bei dem relativ hohe Umsatzraten beobachtet werden konnten, aber keine toxischen Erscheinungen bei den Zellkulturen auftraten. Der Einfluß von 7-Ethoxyresorufin auf die Proliferation von Hep G2-Kulturen wird in 4.1.2.10 besprochen.

2.3.1.2 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung in Zellhomogenaten und in subzellulären Fraktionen

Hep G2-Zellen und Rattenhepatozyten zeigten nach Ultraschallaufschluß eine geringfügig höhere Umsatzrate von 7-Ethoxyresorufin als in der Kultur (siehe Tabelle 2-4), welches in der besseren Zugänglichkeit der Enzyme für die Substrate begründet sein könnte. Auch konnte gezeigt werden, daß die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung induzierbar war. Wiederum war 3-MC bei der Hep G2-Kultur der stärkere Induktor. Die Glucuronidierungs-raten wurden nicht bestimmt.

Zellhomogenat	Umsatz [nmol/10 ⁶ Zellen/h]
Hep G2-Zellen	3,32 ± 0,26
Hep G2-Zellen induziert mit 3-MC	6,9 ± 0,3
Hep G2-Zellen induziert mit PB	4,1 ± 0,3
Hepatozyten	1,55 ± 0,1

Tabelle 2-4: 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung in Zellhomogenaten nach Ultraschallbehandlung, $\bar{x} \pm s$, n=6

Bei der Untersuchung der Verteilung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität auf die Zellorganellen (siehe Abbildung 2-11) konnte gezeigt werden, daß die für die Umsetzung von 7-Ethoxyresorufin verantwortlichen Enzyme in den Mikrosomen lokalisiert waren. Restaktivitäten im Zytosol könnten auf eine unvollständige Trennung von Zytosol und Mikrosomen hinweisen. Die daneben auftretenden geringen Aktivitäten in Mitochondrien und Lysosomen könnten die selbe Ursache haben oder aber auf geringe CYP-Konzentrationen in diesen Organellen hinweisen. Auffällig war, daß die Aktivität in isolierten Mikrosomen höher war als im Zellhomogenat, welches möglicherweise auf einen beschleunigten Abbau von CYP durch freigesetzte lysosomale Proteasen im Zellhomogenat zurückgeführt werden könnte.

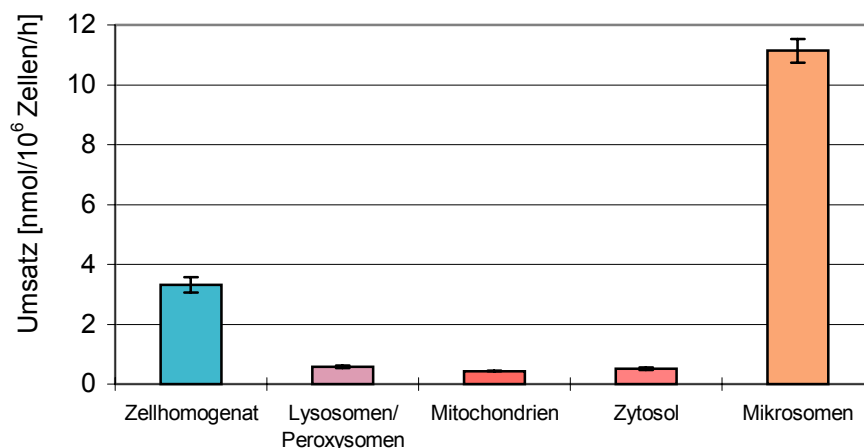


Abbildung 2-11: Verteilung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität in den sub-zellulären Fraktionen von Hep G2-Zellen, $\bar{x} \pm s$, n=6

2.3.1.3 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung durch Rattenlymphozytenkulturen

Die Ergebnisse der Biotransformation von 7-Ethoxyresorufin durch Lymphozytenkulturen sind in Abbildung 2-12 dargestellt. Da bei Lymphozyten keine UDP-Glucuronyltransferase- und Sulfataseaktivitäten zu erwarten sind [59], wurde auf eine Deglucuronidierung und -sulfatierung verzichtet.

Anders als von Stephen et al. [101] berichtet, konnten geringe, aber detektierbare 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivitäten in Lymphozyten gefunden werden. Im Gegensatz zu humanen Lymphozyten, scheinen Lymphozyten der Ratte CYP 1 A1 und 2 auch ohne Induktion zu besitzen [46]. Die Enzymaktivität war während der ersten Stunde am höchsten und nahm dann über 72h ab. Nach Inkubation mit Concanavalin A blieb sie höher und die Umsatzrate stieg um das 1,5-fache an. PB-Inkubation führte nicht zu einer Induktion, sondern zu einer leichten Hemmung der Enzymaktivität. Eine Behandlung mit Concanavalin A erhöhte wiederum die Umsatzrate. Die höchste Induktion konnte bei 3-MC behandelten Lymphozyten beobachtet werden. Hier war die Umsatzrate 2-fach erhöht. Eine zusätzliche Behandlung mit Concanavalin A steigerte die Bildung von Resorufin nochmals um knapp 20% und führte nicht, wie für Thymuslymphozyten und dem Induktor 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin beschrieben, zu einer Inhibition der Enzymaktivität [101].

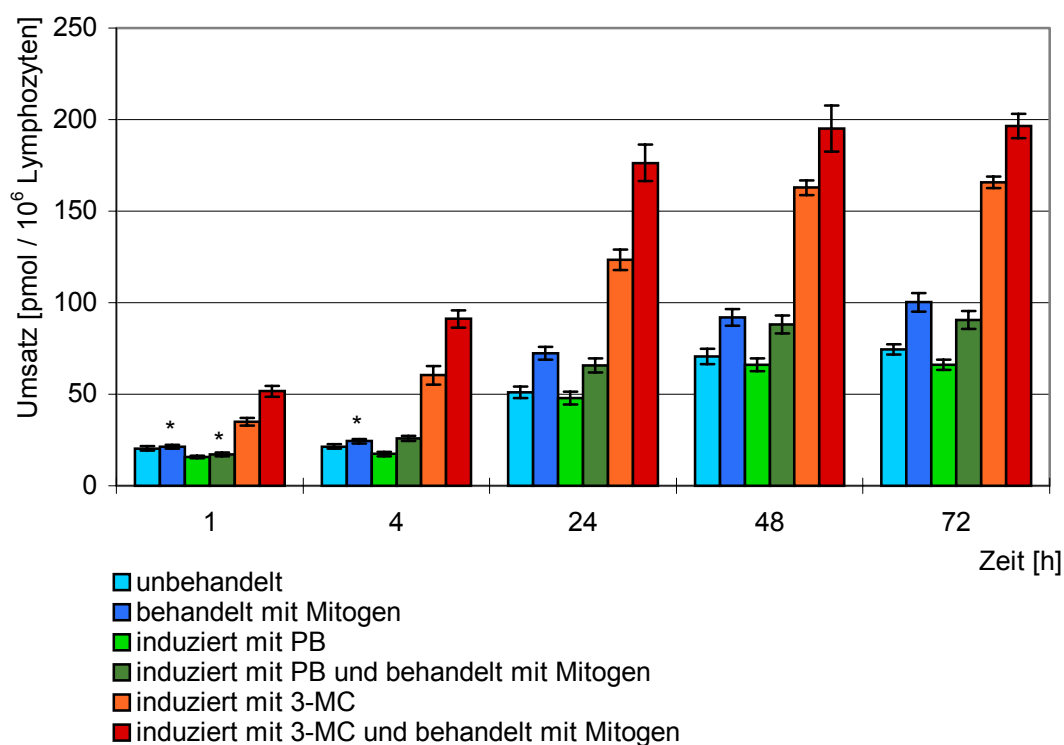


Abbildung 2-12: Umsatz von 7-Ethoxyresorufin durch Lymphozyten der Wistar-Ratte, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,01$ bzw. $*\alpha < 0,05$

Durch Fung et al. [35] konnte gezeigt werden, daß Lymphozyten der Ratte sowohl konstitutiv als auch nach Induktion mit 3-MC CYP 1 A1, nicht aber CYP 1 A2, enthalten. Es kann also angenommen werden, daß die beobachtete 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität nur auf CYP 1 A1-Aktivität zurückzuführen ist.

2.3.2 7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung

Ein weniger spezifisches Substrat für CYP 1 A1 und 2 ist 7-Ethoxycoumarin. Dessen Umsetzung wird weiterhin von CYP 2 B1 und 2 und CYP 2 A1 katalysiert [78]. Die CYP 2 B-Familie wird vor allem durch Barbiturate induziert, wobei Phenobarbital der stärkste Induktor durch transkriptionale Aktivierung und Stabilisierung der mRNA ist. CYP 2 B2 ist in der Leber der Ratte konstitutiv, während CYP 2 B1 nur in Lunge und Testis konstitutiv, in allen anderen Geweben aber induzierbar ist. Auch CYP 2 A1 kommt in der Leber konstitutiv vor und kann durch PB und 3-MC induziert werden [98]. Da also sowohl PB- als auch 3-MC-induzierbare CYP an der Umsetzung von 7-Ethoxycoumarin beteiligt sind, ist zu erwarten, daß die Vorbehandlung mit PB einen stärkeren Einfluß zeigt als bei der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung.

Die Aktivitäten der CYP 2 A1, 2 B1 und 2 werden in vivo stark beeinflusst von Wachstums-

hormonen und sind damit altersabhängig. CYP 2 A1-Aktivitäten hängen darüber hinaus vom Geschlecht ab und ändern sich bei Diabetes oder hohem Blutdruck, während CYP 2 B1 und 2 sich bei Hunger erhöhen [98].

Der Mechanismus der Deethylierung von 7-Ethoxycoumarin findet wie unter 2.3.1 für 7-Ethoxyresorufin beschrieben statt. Die Fluoreszenz des entstandenen 7-Hydroxycoumarins (siehe Abbildung 2-13) ist stark abhängig von der Temperatur und vom pH der wässrigen Lösungen in der es bestimmt wird. Deshalb ist eine genaue Standardisierung der Temperatur, des pH-Werts und der Zeit der Messung nach Reextraktion in wässriges Milieu unbedingt erforderlich [82].

Aufgrund der entstandene freie Hydroxylgruppe, die prinzipiell konjugiert werden kann, ist eine Deglucuronidierung und -sulfatierung zur Bestimmung des Gesamtumsatzes erforderlich.

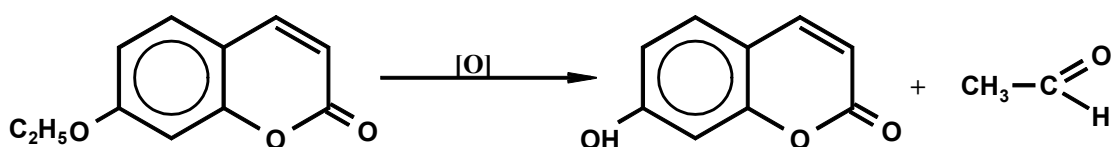


Abbildung 2-13: 7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung

2.3.2.1 7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen

In Abbildung 2-14 ist die Umsatzrate von 7-Ethoxycoumarin durch unbehandelte und induzierte Hep G2-Zellen sowie durch Hepatozyten der Ratte dargestellt.

Alle Kulturen zeigten die höchste Aktivität in der ersten Stunde, danach blieb die Aktivität der 3-MC-induzierten Hep G2-Zellen am höchsten. PB-induzierte Hep G2-Zellen zeigten hier eine deutlich höhere Aktivitätserhöhung als bei der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung, welches bestätigt, daß an der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung nicht nur die 3-MC-induzierbaren CYP 1 A1- und 2-, sondern auch die PB induzierbare CYP 2 B1- und 2-Isoenzyme an der Umsetzung beteiligt sind. Doch scheinen letztere in einem geringeren Maß die Deethylierung zu katalysieren oder aber ihre Induzierbarkeit ist im Vergleich zu den 3-MC-induzierten Formen geringer. Dawson et al. [17] fanden für die Induzierbarkeit der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung ähnliche Ergebnisse, doch waren die Gesamtumsatzraten wesentlich niedriger als die hier gezeigten, was durch einen geringen Zusatz von fetalem Kälberserum (5%) begründet sein könnte. Nach 4h Inkubationszeit wurden von Dawson et al. eine 1,3-fache Erhöhung der Umsatzrate für PB-induzierte Kulturen und eine 32-fache für 3-MC-induzierte Kulturen gefunden. Die in Abbildung 2-14 dargestellten Werte ergeben eine 1,1-fache bzw. 1,7-

fache Erhöhung für PB bzw. 3-MC nach 4h und eine 2,8-fache bzw. 5,4-fache Erhöhung für PB bzw. 3-MC nach 72h Inkubationszeit. Trotz höherem Gesamtumsatz, ist hierbei die Induktion geringer. Allerdings wurden von Dawson et al. höhere Konzentrationen der Induktoren eingesetzt, nämlich 1mM PB statt 0,8mM und 5µM 3-MC statt 1,5µM, wobei 5µM 3-MC auf Hep G2-Zellen stark toxisch wirkten (siehe 4.1.2.5).

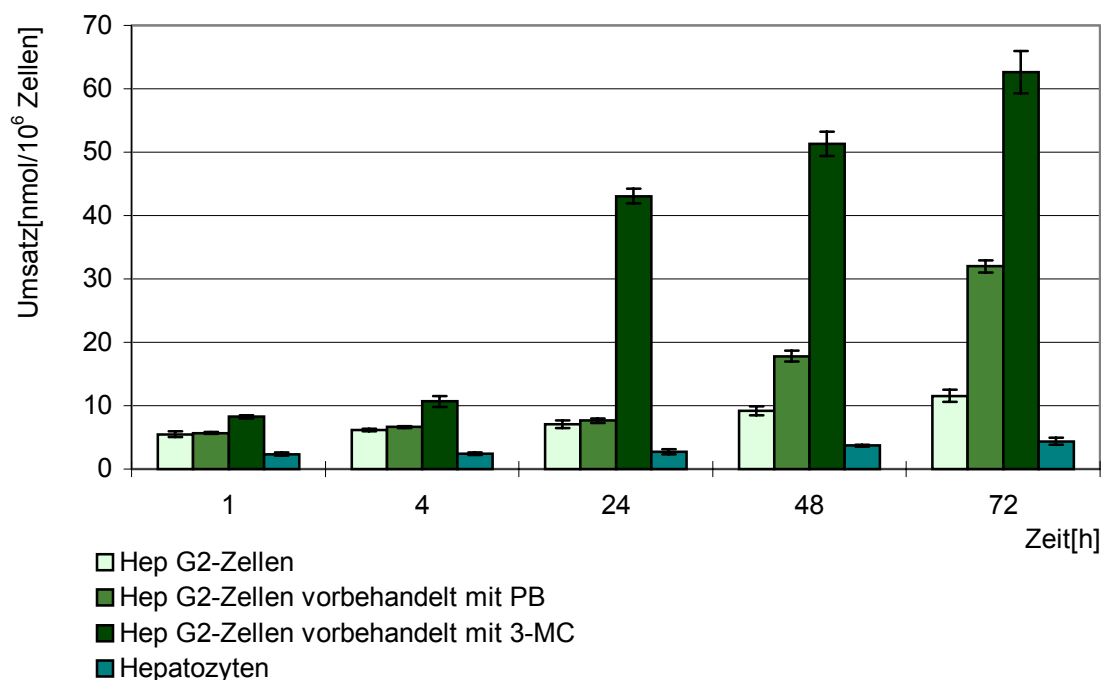


Abbildung 2-14: Umsatz von 7-Ethoxycoumarin durch Hep G2-Zellkulturen und Hepatozyten der Wistar-Ratte, $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $\alpha<0,01$

Die Enzymaktivität der Hepatozyten war, wie auch schon bei der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung, geringer als bei Hep G2-Kulturen. Zwar wurden auch höhere Aktivitäten (4-10nmol/10⁶ Zellen/h) von Rattenhepatozytenkulturen über 1h berichtet [49, 82], diese lagen aber nicht wesentlich höher, als die von unbehandelten Hep G2-Zellen (5,5nmol/10⁶ Zellen/h).

2.3.2.2 7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung durch Zellhomogenate und subzelluläre Fraktionen

Sowohl in Hepatozyten als auch in Hep G2-Zellen war die Aktivität der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase nach Ultraschallbehandlung größer als in der Zellkultur, wie in Tabelle 2-5 zu sehen ist. Eine Induktion der Enzymaktivität durch 3-MC führte zu einer 1,6-fachen Erhöhung und war damit geringer als bei der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung. Die Induktion mit PB fiel mit einer

1,25-fachen Zunahme genauso hoch aus, wie bei 7-Ethoxyresorufin, war aber höher als in der Zellkultur, bei der sich eine Erhöhung der Umsatzrate durch PB erst nach 48h bemerkbar machte. Insgesamt unterstreicht dieses Ergebnis noch einmal die geringere Induzierbarkeit der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase-Aktivität durch 3-MC, was auf einen höheren Anteil an CYP 2 B1- und 2- sowie CYP 2 A1-Aktivität als bei der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung hinweist.

Zellhomogenat	Umsatz [nmol/10 ⁶ Zellen/h]
Hep G2-Zellen	7,2 ± 0,6
Hep G2-Zellen induziert mit 3-MC	11,45 ± 1,1
Hep G2-Zellen induziert mit PB	9,02 ± 0,72
Hepatozyten	3,6 ± 0,27

Tabelle 2-5: 7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung in Zellhomogenaten nach Ultraschallbehandlung, $\bar{x} \pm s$, n=6

Die Untersuchungen der Verteilung der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase-Aktivität auf die Zellorganellen zeigten ähnliche Ergebnis wie die der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase. Die höchste Aktivität konnte in den Mikrosomen gefunden werden, während die Restaktivitäten in Zytosol, Mitochondrien und Lysosomen sehr gering waren. Auch hier war die Aktivität in den Mikrosomen höher als im Zellhomogenat, was wiederum auf den Abbau von CYP durch nach Ultraschallbehandlung frei gewordenen lysosomalen Proteasen zurückgeführt werden könnte.

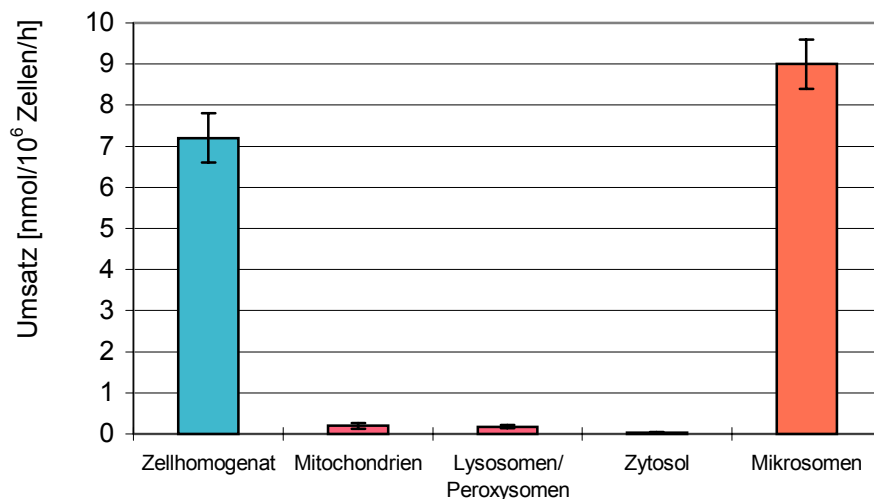


Abbildung 2-15: Verteilung der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase-Aktivität auf die subzellulären Fraktionen von Hep G2-Zellen, $\bar{x} \pm s$, n=6

2.3.3 Aminophenazon-N-demethylierung

Aminophenazon (Pyramidon®) ist ein Pyrazolin-5-on, das als Analgetikum, Antipyretikum und Antiphlogistikum zum Einsatz kam, aber wegen des Risikos der Entstehung des karzinogenen N-Nitrosodimethylamins aus der Dimethylaminogruppe 1978 aus dem Handel gezogen wurde [92].

Seine drei Hauptmetaboliten in vivo sowie in vitro entstehen durch Demethylierung zum sekundären und schließlich zum primären Amin (siehe Abbildung 2-16) und durch Hydroxylierung zu 3-Hydroxymethyl-2-methyl-4-dimethylamino-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on [29]. Die Bildung von 2-Methyl-4-monomethylamino-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on ist bei der primären Hepatozytenkultur der Ratte der Hauptabbauweg von Aminophenazon. Dieser Metabolit ist nach Inkubation in einer 10mal höheren Konzentration vorhanden als alle anderen Metaboliten. Das primäre Amin und in 3-Stellung hydroxyliertes Aminophenazon entstehen nur in vergleichsweise geringen Mengen. Weitere Metaboliten sind 4-Acetyl- und 4-Formylamino-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on [94].

Die Demethylierung von Aminophenazon (siehe Abbildung 2-16) wird vor allem durch CYP 3 A1 und 2 katalysiert. CYP 3 A1 und 2 werden besonders spezifisch durch Pregnenolon-16 α -carbonitril induziert. Weniger spezifische Induktoren sind andere Steroide, z.B. Dexamethason, aber auch PB und Makrolidantibiotika, nicht aber 3-MC [78]. CYP 3 A2 kommt in der Leber und im Darm der Ratte konstitutiv vor und seine Aktivität hängt vom Alter und vom Geschlecht ab. Auch Wachstumshormone, Diabetes und Hunger verändern die Enzymaktivität. CYP 3 A1 kann

in allen Geweben induziert werden [98].

Bei der oxidativen Demethylierung von Aminophenazon erfolgt der Angriff des aktivierten Sauerstoffs an der Methylgruppe. Es entsteht ein Carbinolamin, das wegen geringer Stabilität schnell in das sekundäre bzw. primäre Amin und Formaldehyd zerfällt [79].

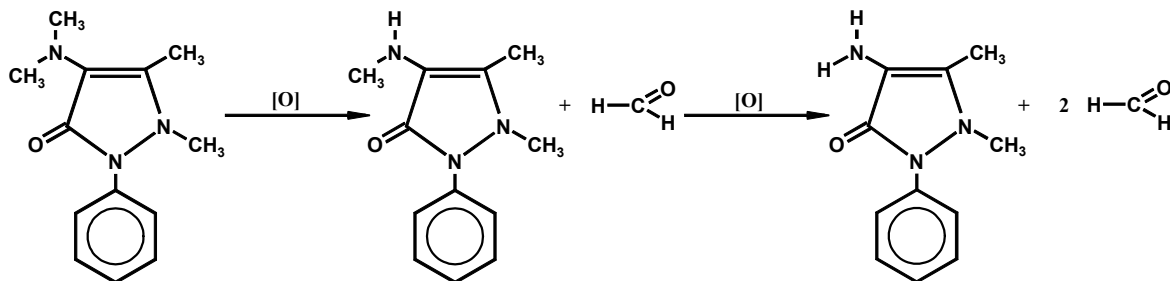


Abbildung 2-16: Demethylierung von Aminophenazon

Die Bestimmung des entstandenen Formaldehyds wurde nach der Methode von Nash et al. [75, 112] durchgeführt. Dabei wird gebildeter Formaldehyd mit Acetylaceton in Gegenwart von überschüssigem Ammoniumsalz zu 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin umgesetzt, welches photometrisch bestimmt werden kann.

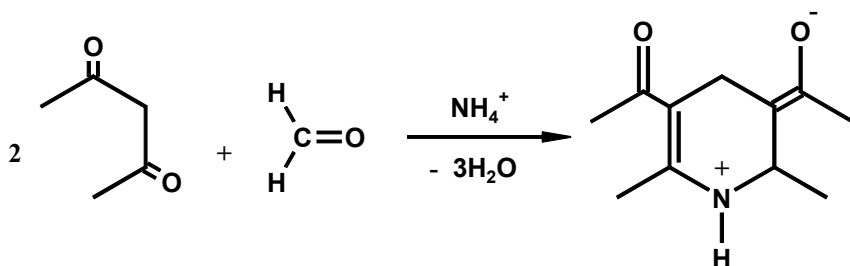


Abbildung 2-17: Formaldehydbestimmung nach Nash

2.3.3.1 Aminophenazon-N-demethylierung durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen

Wie in Abbildung 2-18 zu erkennen ist, war die Demethylierung von Aminophenazon in Hepatozytenkulturen wesentlich höher als in Hep G2-Zellen. Selbst eine Induktion der Hep G2-Zellen mit Dexamethason führte nicht zu einer ähnlich hohen Umsatzrate, sondern nur zu einer 1,5-fachen Erhöhung. Die Induktion mit Phenobarbital fiel mit einer 1,3-fachen Erhöhung ebenfalls gering aus und der Effekt von 3-MC auf die Demethylierung war noch geringer.

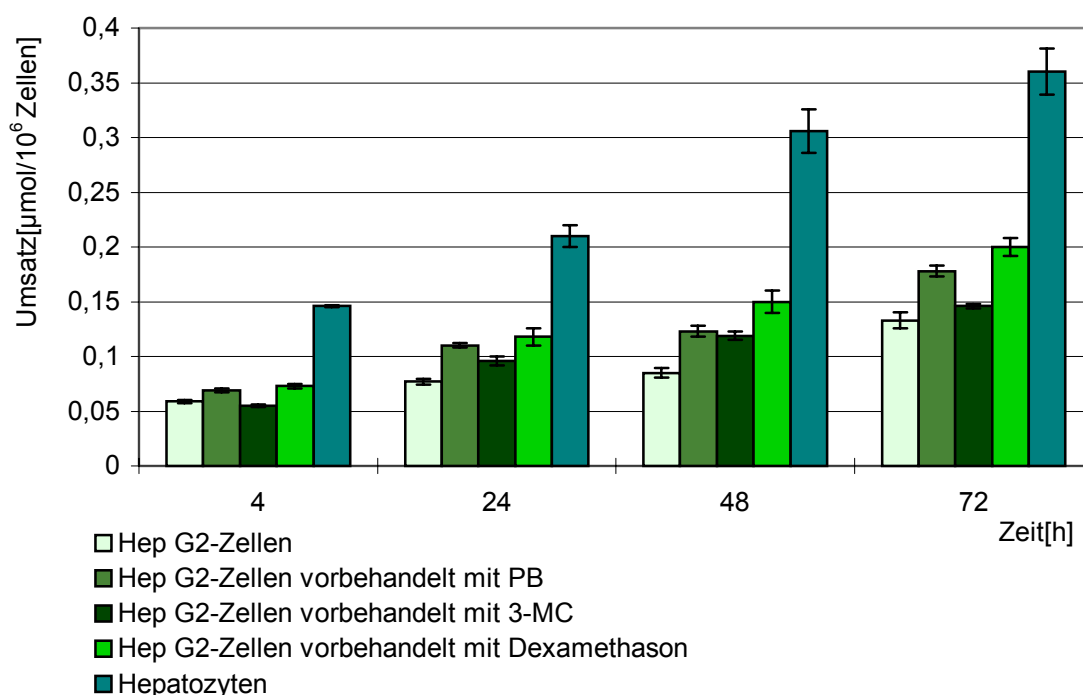


Abbildung 2-18: Aminophenazondemethylierung durch Hep G2-Zellen und Hepatozyten der Wistar-Ratte, $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $\alpha < 0,01$

2.3.3.2 Aminophenazon-N-demethylierung durch Zellhomogenate und isolierte Zellorganellen

Hep G2-Zellen und Hepatozyten zeigten nach Behandlung mit Ultraschall ähnliche Umsatz-raten bei der Aminophenazon-N-demethylierung (siehe Tabelle 2-6). Da Hepatozyten einen wesentlich höheren Umsatz in der Zellkultur hatten, war dies überraschend. Möglicherweise sind die an dieser Reaktion beteiligten CYP-Isoenzyme im Zellhomogenat von Ultraschall behandelten Hepatozyten wesentlich stärker einer Zersetzung durch lysosomale Proteasen ausgesetzt als in Hep G2-Zellhomogenaten. Insgesamt zeigten hier Hep G2 Zellen sogar einen geringfügig höheren Umsatz als Hepatozyten.

Zellhomogenat	Umsatz [nmol/10 ⁶ Zellen/h]
Hep G2-Zellen	11,7 ± 0,33
Hepatozyten	9,3 ± 0,5

Tabelle 2-6: Aminophenazon-N-demethylierung durch Zellhomogenate, $\bar{x} \pm s$, $n=6$

Daß in Hep G2-Zellen ebenfalls eine Zersetzung von CYP 3 A1 und 2 stattfand, ist in Abbildung

2-19 zu erkennen. Das Zellhomogenat zeigte einen wesentlich geringeren Umsatz als die Mikrosomenfraktion nach Isolierung der Zellorganellen. Auch in Lysosomen und Mitochondrien, sowie im Zytosol, konnten relevante Aminophenazon-N-demethylase-Aktivitäten nachgewiesen werden.

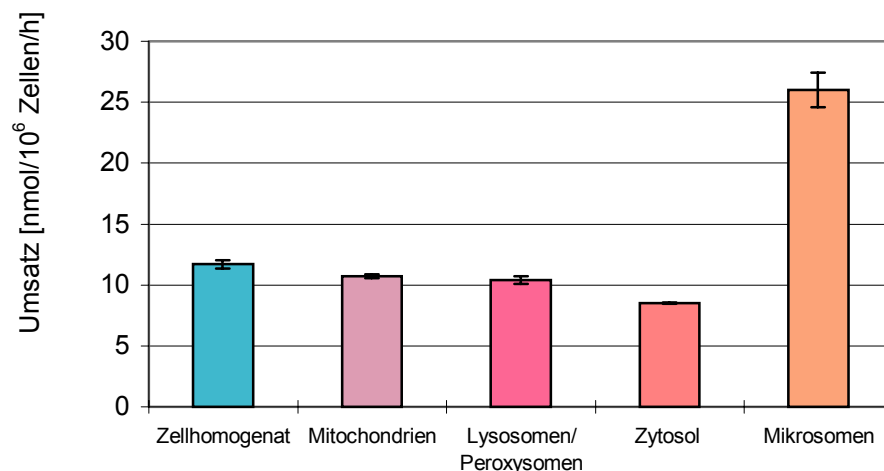


Abbildung 2-19: Verteilung der Aminophenazon-N-demethylase-Aktivität auf die subzellulären Fraktionen von Hep G2-Zellen, $\bar{x} \pm s$, n=6

2.3.4 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion

Die Reduktion von 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen (DAB) wird durch die CYP 4 A-Isoenzyme katalysiert.

CYP 4 A-Isoenzyme kommen bei der Ratte in Leber und Niere konstitutiv vor und können durch Peroxisomen-proliferierende Agenzien, wie z.B. der hypolipidämische Arzneistoff Clofibrat, über die Aktivierung der Transkription mittels PPAR (peroxysome proliferator activated receptor) induziert werden [97].

Substrate für CYP 4 A sind normaler Weise gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (C₆-C₁₂), die in ω -Stellung hydroxyliert werden. Zu einem geringeren Anteil und durch andere CYP-Isoenzyme, wie z.B. CYP 2 E1, kann auch eine Hydroxylierung in ω -1-Stellung stattfinden [13]. Durch ω - und ω -1-Hydroxylierung entstehen primäre sowie sekundäre Alkohole, die weiter metabolisiert werden zu Dicarbonsäuren bzw. ω -1-Oxo-Fettsäuren. Die Dicarbonsäuren können dann der peroxysomalen β -Oxidation zugeführt werden. Die CYP 4 A-Subfamilie hat eine besonders hohe Spezifität für das Substrat Laurinsäure und ist weiterhin am Metabolismus der Arachidonsäure und deren Folgeprodukten beteiligt [78].

Die Karzinogenität der meisten Azofarbstoffen, wie z.B. DAB, beruht auf einer intakten Azofunktion. Daher ist die Reduktion von DAB und anderen Azoverbindungen ein

Hauptabbauweg zur Inaktivierung dieser Karzinogene. DAB wird aber auch oxidativ metabolisiert über N-Demethylierung, Ringhydroxylierung und N-Hydroxylierung. Diese Reaktionen werden durch PB und 3-MC induzierbare CYP-Formen katalysiert, die Reduktion von DAB aber ausschließlich durch Clofibrat induzierbare CYP [81,102]. DAB wird weiterhin auch durch NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase unter anaeroben Bedingungen [62] und durch zytosolische Reduktasen [45] reduziert.

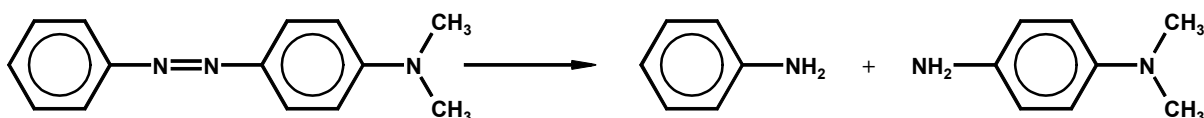


Abbildung 2-20: Azoreduktion von 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen

Das gebildete 4-(N,N-Dimethylamino)anilin kann nach der Methode von Huang et al. [45] bestimmt werden. Nur dieses Produkt wird unter den Bedingungen dieses Assays extrahiert. Nach der Extraktion wird 4-(N,N-Dimethylamino)anilin an Fluorescamin gekuppelt, wobei ein stark fluoreszierendes Produkt entsteht. Fluorescamin kann auch zur Bestimmung von primären Aminogruppen in Proteinen oder von Aminosäuren genutzt werden [45].

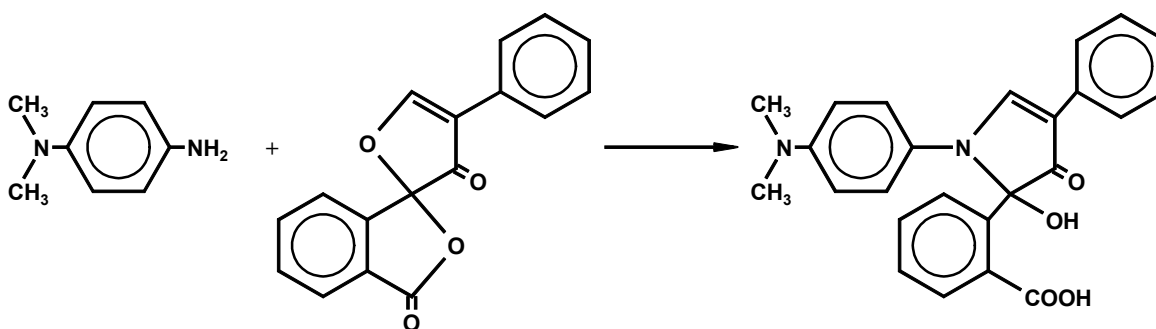


Abbildung 2-21: Kupplung von 4-(N,N-Dimethylamino)anilin an Fluorescamin

2.3.4.1 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen

Die Reduktion von DAB durch Hep G2- und Hepatozytenkulturen ist in Abbildung 2-22 dargestellt:

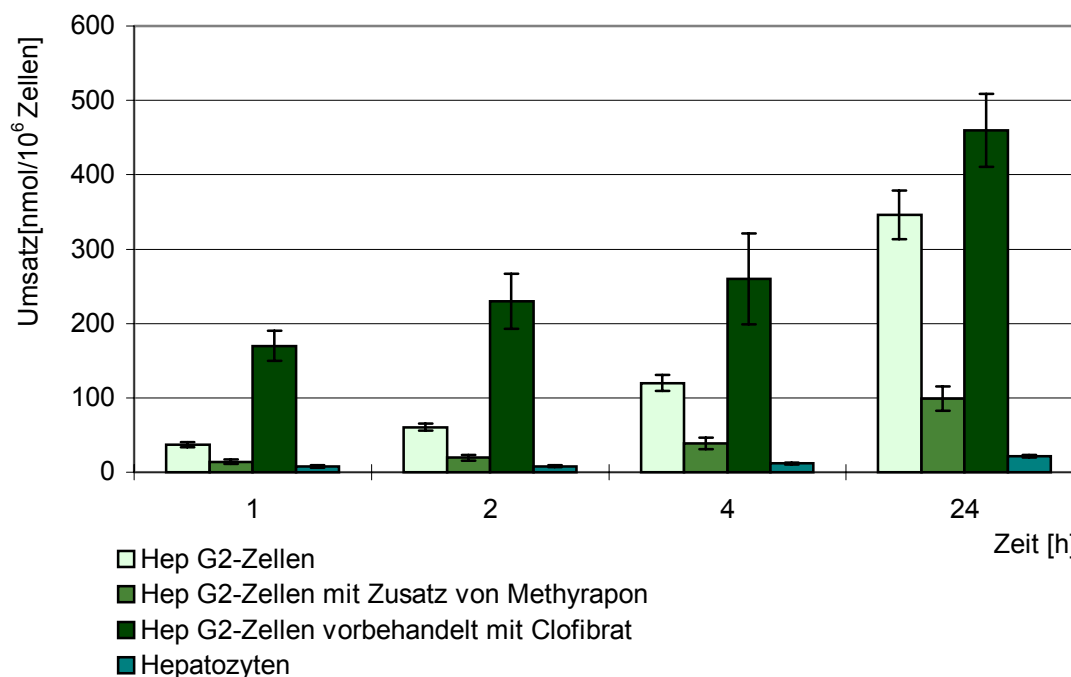


Abbildung 2-22: Azoreduktion von DAB durch Hep G2-Zellen und Hepatozyten der Wistar-Ratte, $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $\alpha < 0,01$

Die Umsatzrate von DAB durch Hep G2-Zellen ließ sich erheblich steigern durch Vorbehandlung mit Clofibrat. Es kam zu einem 4,5-fachen Umsatz während der ersten Stunde. Der Unterschied zwischen unbehandelten und Clofibrat behandelten Zellen wurde während 24h Inkubationszeit kleiner und war schließlich nur noch 1,3-fach. Da Clofibrat ein CYP-spezifischer Induktor ist, kann die Erhöhung der Aktivität auf eine Erhöhung der CYP-Aktivität zurückgeführt werden. Durch Inkubation mit Metyrapon kam es wie erwartet zu einer Senkung der Umsatzrate um 60-70%, aber es blieb eine Restaktivität zurück, die der Aktivität der zytosolischen Azoreduktasen entsprechen könnte, da diese nicht durch Metyrapon gehemmt werden [45].

Eine Vorbehandlung mit 3-MC und PB führte zu einer leichten Inhibition der Azoreduktaseaktivität, obwohl von Huang et al. [45] eine Induzierbarkeit der zytosolischen Azoreduktasen durch 3-MC berichtet wurde. Eine Verringerung der Umsatzrate durch Vorbehandlung mit PB wurde auch von Raza et al. [81] für Rattenhepatozyten gefunden. Für frisch isolierte Hepatozyten konnte nur eine 13,5% Inhibition der Azoreduktion von DAB durch Metyrapon

gefunden werden. Eine stärkere Hemmung wurde durch andere CYP-Inhibitoren, wie z.B. α -Naphthoflavon erreicht.

Hepatozyten der Ratte zeigten eine deutlich geringere Aktivität als Hep G2-Zellen. Der geringe Anstieg der Umsatzrate mit der Zeit kann darauf zurückzuführen sein, daß die Aktivität der Azoreduktion während der ersten 24h der Kultivierung stark absinkt [102]. Stoddart et al. [102] fanden ähnliche, aber etwas höhere Aktivitäten der Azoreduktase, die aber immer noch niedriger waren, als die hier dargestellten von Hep G2-Zellen.

Der Anteil von CYP 4-Aktivität an der Azoreduktion von DAB scheint sowohl in Hep G2-Zellen als auch in Hepatozyten der Ratte [102] relativ hoch zu sein. Eine Induktion durch Clofibrat, bzw. eine Hemmung der CYP-Aktivität durch CYP-Inhibitoren ist bei beiden Systemen möglich.

2.3.4.2 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion durch Zellhomogenate und subzelluläre Fraktionen

Die Reduktion von DAB durch Hep G2-Zellen nach Ultraschallbehandlung (siehe Tabelle) war geringer als in intakten Zellkulturen. Dies traf auch auf Hepatozyten zu. Ein Grund für dieses Phänomen könnte eine vermehrte Spaltung des CYP 4 A-Isoenzym durch freigesetzten lysosomale Proteasen sein. Auch hier zeigte sich deutlich die Induzierbarkeit der Azoreduktase-Aktivitäten durch Zusatz von Clofibrat. Hepatozyten hatten, wie in der Zellkultur eine geringere Umsatzrate als unbehandelte Hep G2-Zellen.

Zellhomogenat	Umsatz in nmol/10 ⁶ Zellen/h
Hep G2-Zellen	17 \pm 1,1
Hep G2-Zellen induziert mit Clofibrat	33 \pm 4
Hepatozyten der Wistar-Ratte	5,9 \pm 0,6

Tabelle 2-7: Azoreduktase-Aktivität in Zellhomogenaten nach Ultraschallbehandlung, $\bar{x} \pm s$, n=6

Die Verteilung der Azoreduktase-Aktivität auf die Zellorganellen zeigte deutlich, daß Azoreduktase sowohl in den Mikrosomen als auch im Zytosol vorhanden war, wobei die zytosolische Aktivität, im Gegensatz zu der mikrosomalen, nicht auf CYP zurückzuführen ist [62, 81, 102]. Azoreduktase-Aktivität in den Lysosomen und Mitochondrien waren sehr gering und nur schwer detektierbar, weshalb angenommen werden kann, daß sie auf Grund einer unvollständigen Trennung der Organellen entstanden sein könnten.

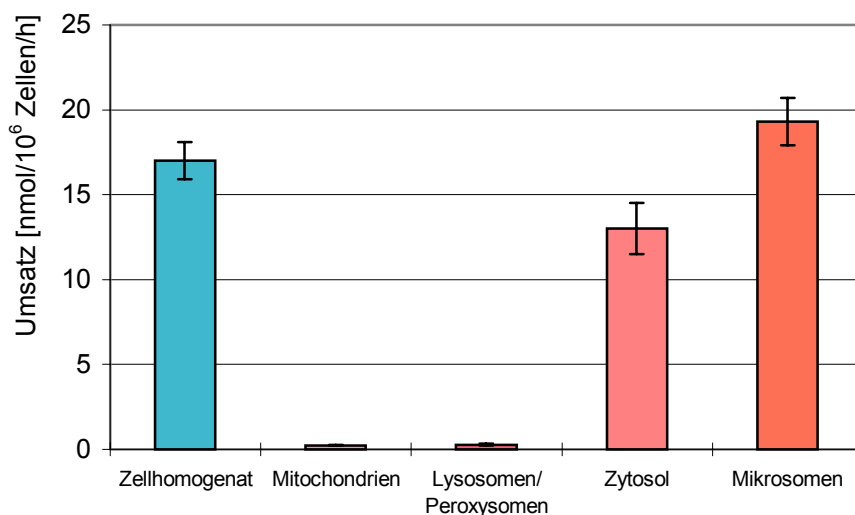


Abbildung 2-23: Verteilung der Azoreduktase-Aktivität auf die subzellulären Fraktionen von Hep G2-Zellen, $\bar{x} \pm s$, n=6

2.3.4.3 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion durch Rattenlymphozytenkulturen

Im Gegensatz zu den Umsatzraten bei Hep G2-Zellen und Hepatozyten, ist der Umsatz von DAB durch Lymphozyten der Ratte nicht im mikromolaren sondern im nanomolaren Bereich. Die Umsatzrate konnte sowohl durch den CYP 4 A-spezifischen Induktor Clofibrat als auch und in wesentlich höherem Maß durch das Mitogen Concanavalin A erhöht werden. Metyrapon führte zwar zu einer Hemmung der Enzymaktivität, aber die Inhibition war wesentlich kleiner als bei Hep G2-Zellen. Gründe dafür könnten eine unvollständige Hemmung von CYP 4 A oder ein höherer Anteil an zytosolischen Reduktasen an der Azoreduktion sein. Daß an der Enzymaktivität CYP 4 A beteiligt ist, zeigte die Induzierbarkeit der Aktivität durch Clofibrat. Die Erhöhung der Umsatzrate durch Concanavalin A ist wesentlich stärker, als es bei der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung beobachtet werden konnte. Es ist möglich das diese starke Zunahme der Umsatzrate nicht allein auf die Aktivität von CYP-Isoenzymen zurückzuführen ist, sondern daß durch die allgemeine Zunahme der Proteinsynthese nach Behandlung mit Concanavalin A ein Anstieg von zytosolischen Reduktasen stattgefunden hat.

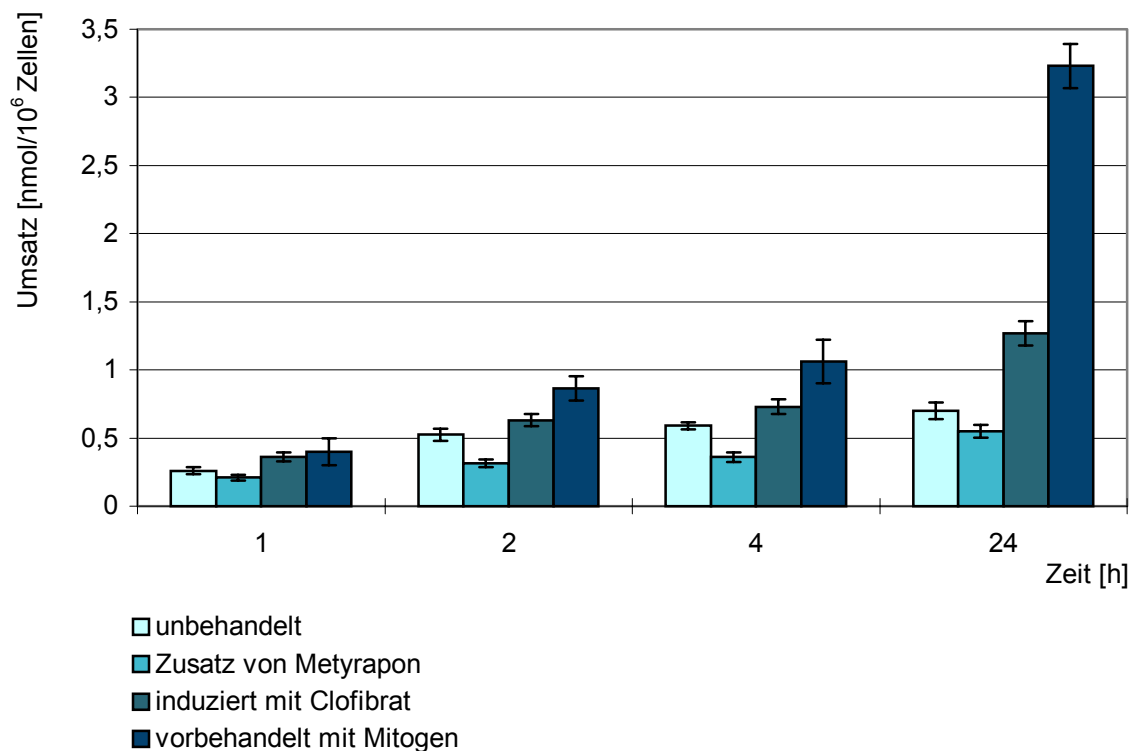


Abbildung 2-24: Azoreduktion von DAB durch Lymphozyten der Wistar-Ratte, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,01$

Auch hier konnte, wie bei der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung (siehe 2.3.1.3), nicht nur die Stimulierung der Lymphozyten, sondern auch eine Veränderung der biotransformatorischen Eigenschaften durch Behandlung mit dem mitogenen Lektin Concanavalin A beobachtet werden.

2.3.5 p-Nitrophenol-Konjugation

Die Konjugation von lipophilen Substanzen mit Glucuronsäure und Sulfaten (siehe Abbildung 2-25) ist die bedeutendste Phase II-Reaktion. Die zu konjugierenden Substanzen müssen die entsprechenden strukturellen Voraussetzungen, z.B. eine Hydroxy- oder Carbonylgruppe, besitzen. Das Ziel der Konjugierung ist die Inaktivierung, Detoxifikation und Elimination unterschiedlicher Arzneistoffe, Umweltchemikalien und endogener Substanzen. Dabei wird die Hydrophilie dieser Substanzen erhöht, damit diese durch Galle oder Urin ausgeschieden werden können.

UDP-Glucuronyltransferasen sind membrangebundene Enzyme des endoplasmatischen Retikulums der Leber und anderer Organe, die viele Verbindungen mit dem Zucker UDP-Glucuronsäure zu Glucuroniden konjugieren. Dazu gehören nicht nur exogene Substanzen, wie Arzneistoffe, Farbstoffe, Pestizide usw., sondern auch endogene Substanzen z.B. Bilirubin,

Gallensäuren, Steroide und fettlösliche Vitamine.

UDP-Glucuronyltransferasen übertragen Glucuronsäure auf Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel oder Kohlenstoffatome des Akzeptormoleküls. Dazu muß UDP-Glucuronsäure zuerst an das aktive Zentrum der UDP-Glucuronyltransferase binden, wodurch die α -Bindung zu UDP gelockert wird. Nun kann es zu einer Bindung mit einem nucleophilen Akzeptormolekül auf der anderen Seite der Glucuronsäure kommen, wobei ein β -D-Glucuronid und freies UDP entsteht [67].

Die p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase ist die am stärksten durch 3-MC induzierbare Form in der Rattenleber, sie kommt aber auch in der Niere, Lunge, Darmmukosa, Milz und in der Haut vor. Außer p-Nitrophenol glucuronidiert dieses Enzym auch andere Phenole, wie z.B. 1-Naphthol oder 4-Methylumbelliferon, sowie Phenolgruppen von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, z.B. Benzopyren. Auch andere UDP-Glucuronyltransferasen mit überlappenden Substratspezifität können bei der Glucuronidierung von p-Nitrophenol beteiligt sein.

Sulfotransferasen kommen sowohl im Zytoplasma als auch im endoplasmatischen Retikulum in allen Geweben vor. Auch hier existieren unterschiedliche Enzymformen mit unterschiedlichen und überlappenden Substratspezifitäten, wobei vor allem die Gruppe der Phenol-Sulfotransferasen für die Konjugierung von p-Nitrophenol verantwortlich sein sollten.

Als Cosubstrat dient den Sulfotransferasen 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), in dem die Sulfatgruppe aktiviert vorliegt. Es werden vor allem Phenole und Alkohole, gelegentlich aber auch primäre Amine mit Schwefelsäure verestert.

Die Aktivität der Sulfotransferasen hängt im allgemeinen von Alter und Geschlecht ab. Über Induktion von Sulfotransferasen ist nicht viel bekannt. Einige Sulfotransferasen können durch 3-MC oder Sexualhormone induziert werden [58].

Sulfotransferasen werden auch durch die Interaktionen von Sulfaten und Glucuroniden beeinflusst. Bei niedrigen Substratkonzentrationen dominiert meist die Sulfatierung, während bei höheren Substratkonzentrationen die Glucuronidierung vorherrscht [58, 95]. In vivo sind die Transferasen in der Leber unterschiedlich verteilt. So befinden sich höhere Sulfotransferase-Aktivitäten in periportalen Regionen; Glucuronyltransferasen sind mehr in der perizentralen Region lokalisiert.

In primären Hepatozytenkulturen gibt vor allem das Alter der Kultur den entscheidenden Ausschlag für den Anteil der Sulfate bei der Konjugation einer Substanz. Die Aktivität der Sulfotransferase beginnt schon nach 24h zu sinken, die Aktivität der Glucuronyl-transferasen steigt mit dem Alter der Kultur nachdem sie ein anfängliches Tief von 24h überwunden hat [53].

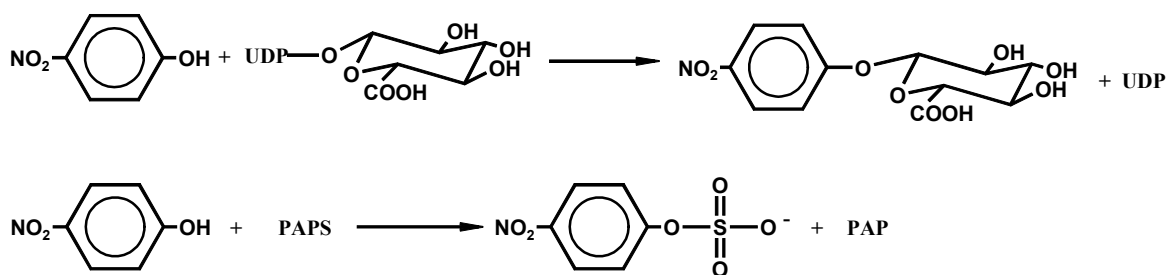


Abbildung 2-25: Glucuronidierung und Sulfatierung von p-Nitrophenol

2.3.5.1 p-Nitrophenolkonjugation durch Hep G2- und Rattenhepatozytenkulturen

Abbildung 2-26 zeigt das Ergebnis der Nitrophenolkonjugation durch unbehandelte Hep G2-Kulturen, sowie 3-MC- und PB-induzierte Kulturen, im Vergleich mit Hepatozytenkulturen der Wistar-Ratte.

Unbehandelte und induzierte Hep G2-Zellen zeigten in den ersten 4h die höchste Enzymaktivität. Danach sank die Aktivität und blieb schließlich über 72h fast konstant. Am höchsten blieb sie bei PB-induzierten Zellen, aber auch 3-MC-induzierte Zellen zeigten eine verstärkte Aktivität gegenüber unbehandelten Hep G2-Zellen.

Obwohl die p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase zu den 3-MC-induzierbaren Transferaseformen gehören soll [67], ist die Umsatzrate bei PB-induzierten Hep G2-Kulturen am höchsten. Bock und Bock-Hennig [11] fanden zwar ebenfalls eine Erhöhung der Umsatzrate nach PB-Induktion bei Hep G2-Zellen, aber eine geringere als bei 3-MC-induzierten. Allerdings wurde hier eine 3-MC-Konzentration gewählt (5µmol), die im Versuch für Hep G2-Zellen stark toxisch war.

Da die Umsatzrate bei PB-induzierten Zellen sehr hoch war, müssen außer 3-MC-induzierbaren Isoformen auch noch andere PB-induzierbare UDP-Glucuronyltransferasen an der Konjugation von p-Nitrophenol beteiligt sein. Eine PB induzierbare Form ist die 4-Hydroxybiphenyl-UDP-Glucuronyltransferase, die auch Phenolphthalein und einige Sexualhormone glucuronidiert [67]. Stark erhöhte Phenolphthaleinglucuronidierung nach PB-Gabe konnte in Rattenhepatozyten und in Hep G2-Zellen beobachtet werden [41].

Grant et al. [41] fanden eine um die Hälfte verringerte UDP-Glucuronyltransferase Aktivität in Hep G2-Zellen verglichen mit humanen Hepatozyten, wobei die hier gefundenen Werte für Hep G-Zellen mit diesen korrelieren. Auch der Anteil an Sulfaten an den Gesamtkonjugaten betrug hierbei wie bei Grant et al. 20%, während es bei humane Hepatozyten 25% Sulfate sein sollen [41].

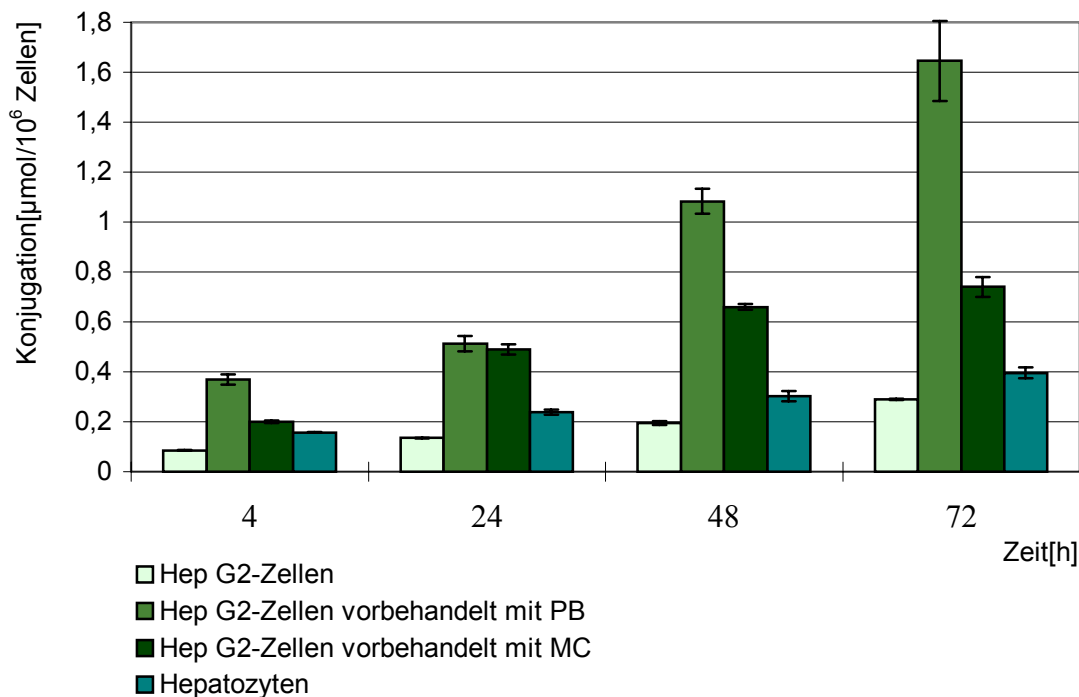


Abbildung 2-26: Konjugation von p-Nitrophenol durch Hep G2-Zellen und Hepatozyten der Wistar-Ratte, $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $\alpha < 0,01$

Die Enzymaktivität in Rattenhepatozyten zeigte einen ähnlichen Verlauf wie in unbehandelte Hep G2-Zellen. Sie war in den ersten 4h höher als in Hep G2-Zellen, sank aber auch ab und blieb schließlich über 72h fast konstant. Der Anteil der Sulfate an den Gesamtkonjugaten dürfte hier größer sein als bei humanen Hepatozyten und Hep G2-Zellen. Shipley et al. [95] berichtete ein Verhältnis von 2:1 von Glucuroniden zu Sulfaten bei der Konjugierung von p-Nitrophenol durch Hepatozyten von männlichen Sprague-Dawley-Ratten.

Unbehandelte Hep G2-Zellen hatten eine geringere Aktivität als unbehandelte Hepatozyten der Ratte. Dies kann durch gezielte Induktion ausgeglichen werden.

2.3.5.2 p-Nitrophenolkonjugation in Zellhomogenaten und subzellulären Fraktionen

Die Ergebnisse der Konjugation von p-Nitrophenol durch mit Ultraschall behandelte Zellen erhärten die Ergebnisse aus 2.3.5.1 (siehe Tabelle 2-8). Hep G2-Zellen zeigten einen etwas geringeren Umsatz als Hepatozyten der Wistar-Ratte. Doch konnte die Konjugationsrate in Hep G2-Zellen erheblich gesteigert werden durch Induktoren.

Auch hier zeigte sich, daß PB der potentere Induktor für die Glucuronyltransferasen bzw. Sulfotransferasen war. Dieses Ergebnis unterstreicht, daß bei der Konjugation von p-Nitrophenol

durch Glucuronyl- und Sulfotransferasen andere, größtenteils PB-induzierbare Isoenzyme beteiligt sein müssen. Bei der Wistar-Ratte wird die Konjugationsrate stärker durch 3-MC beeinflusst [58, 67].

Zellhomogenat	Umsatz [nmol/10 ⁶ Zellen/h]
Hep G2-Zellen	15 ± 1,5
Hep G2-Zellen induziert mit 3-MC	92 ± 1,5
Hep G2-Zellen induziert mit PB	188 ± 6
Hepatozyten	18,2 ± 0,7

Tabelle 2-8: Nitrophenolkonjugation durch Zellhomogenate nach Ultraschallbehandlung, $\bar{x} \pm s$, n=6

Der Hauptort der Konjugation war wie zu erwarten die Mikrosomenfraktion (siehe Abbildung 2-27). Hier findet die Glucuronidierung von Substraten statt [67].

Geringe Aktivitäten im Zytosol könnten auf Glucuronyltransferase-Aktivitäten zurückgeführt werden, die aufgrund unvollständiger Abtrennung der Mikrosomen vorhanden sein könnten.

Da im Zytosol die Sulfotransferasen lokalisiert sind [58], kann weiterhin angenommen werden, daß auch Sulfotransferasen am Umsatz beteiligt waren, obwohl kein weiterer PAPS-Zusatz zum Inkubationsansatz erfolgte. Dies würde voraussetzen, daß sehr geringe Konzentrationen von PAPS, wie sie nach der Auftrennung der einzelnen Fraktionen durch Verdünnungen in der Zytosolfraction vorliegen, für meßbare Aktivitäten der Sulfotransferasen ausreichend sind.

Auch in Mitochondrien und Lysosomen konnten Umsätze detektiert werden, doch waren diese geringfügig und könnten deshalb auch durch unvollständige Trennung von Zytosol oder Mikrosomen entstanden sein.

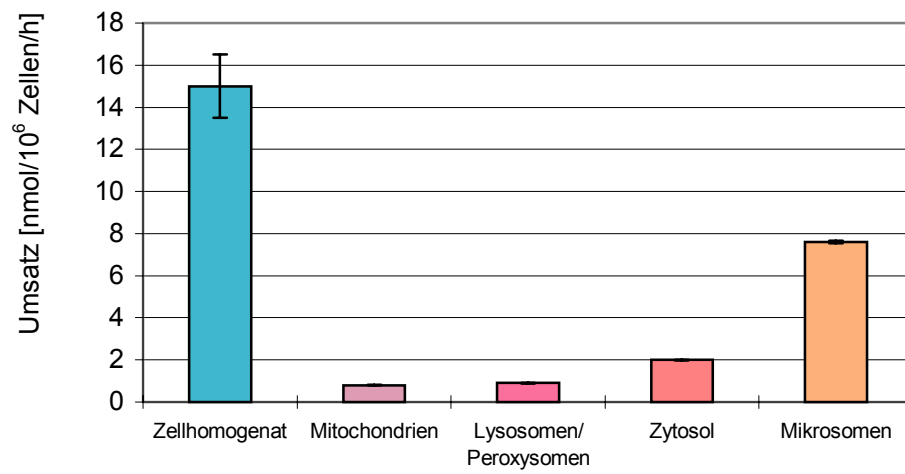


Abbildung 2-27: Verteilung der Konjugierungsaktivität in isolierten subzellulären Fraktionen von Hep G2-Zellen, $\bar{x} \pm s$, n=6

3 Untersuchungen zur Biotransformation von 3 potentiellen Arzneistoffen durch Hep G2-Zellen

3.1 AWD 100-041

AWD 100-041, 3-(2-Mercaptoethyl)chinazolin-2,4(1H, 3H)-dion (siehe Abbildung 3-1), ist eine immunmodulierende Substanz mit stimulierenden und restaurativen Effekten auf das Immunsystem [26, 61, 96].

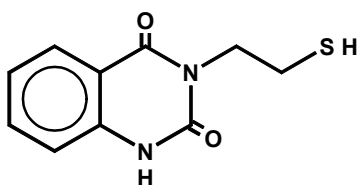


Abbildung 3-1: AWD 100-041

Im Tierversuch erhöht AWD 100-041 nach p.o. Applikation dosisabhängig die antikörperbildenden Zellen. Mittels Plaque-Technik nach Cunningham wurde ein signifikanter Anstieg von IgG-Plaque-bildenden Zellen und IgM-Plaque-bildenden Zellen nachgewiesen.

Der zellproliferierende Effekt konnte durch Immunisieren der Versuchstiere mit Schaferythrozyten und fünftägiger p.o. Verabreichung des Wirkstoffes bestätigt werden. Im Lymphknotenassay und nach entsprechender histologischer Auswertung konnten nach Dinitrofluorbenzen und einmaliger Applikation von AWD 100-041 eine Zunahme der pyroninophilen Lymphoblasten und zellproliferative Effekte nachgewiesen werden. Dies findet bevorzugt im parakortikalen Bereich der Lymphknoten statt. Bei der Untersuchung der Beeinflussung der unspezifischen Immunabwehr durch AWD 100-041 wurde eine verstärkte „Spreading“- bzw. Phagozytoseaktivität bei durch Noxen aktivierten Makro-phagen des Meerschweinchenperitonealexsudats gefunden.

Die immunrestaurative Wirkung von AWD 100-041 konnte durch eine Zurückbildung der supprimierten Antikörperbildung nach Ganzkörperbestrahlung und Behandlung der Versuchstiere mit Zytostatika beobachtet werden. Auch die durch Carageenan verursachte Schwächung der humoralen Immunreaktion konnte zurückgebildet werden. Allerdings war in beiden Fällen die vollständige Wiederherstellung des Immunstatus nicht möglich.

Die immunstimulierende Wirkung von AWD 100-041 scheint auf eine Aktivierung der T-Helfer-Zellen und eine Förderung der Lymphokin- und Antikörpersekretion zurückzuführen zu sein. Bei

thymektomierten Tieren bleibt diese Wirkung aus. Als weitere Wirk-mechanismen werden die Makrophagenaktivierung und die indirekte Stimulation der Proliferation immunkompetenter Zellen durch verstärkte Freisetzung von Wachstumsfaktoren diskutiert [26, 57 , 61, 96].

Bei Untersuchungen zur Pharmakokinetik an Ratte und Kaninchen konnte gezeigt werden, daß AWD 100-041 nach p.o. Applikation aufgrund seiner schwach sauren Eigenschaften durch die Thiolgruppe und seiner Lipophilie recht schnell absorbiert wird. AWD 100-041 zeigt ein relativ großes Verteilungsvolumen und flutet schnell wieder ab. Die Bioverfügbarkeit ist durch den starken metabolischen Abbau eher gering [57].

3.1.1 Aufklärung der durch Hep G2-Kulturen gebildeten Metaboliten

Zur Gewinnung von Metaboliten wurde AWD 100-041 in Kulturmedium gelöst und die Hep G2-Kulturen 72h damit inkubiert. Vor der Extraktion der entstandenen Metaboliten von AWD 100-041 aus dem Kulturmedium wurde eine Konjugatsspaltung durchgeführt, da bei der Hydroxylierung des aromatischen Systems Glucuronide und Sulfate entstanden sein könnten. Anschließend wurde das Kulturmedium mit Chloroform bei saurem und basischem pH extrahiert, da saure und auch basische Metaboliten erwartet wurden.

Der nach Einengen und methanolischer Aufnahme entstandene Extrakt wurde der HPLC unterzogen, wobei die Metaboliten getrennt wurden und gleichzeitig ein Spektrum von ihnen aufgenommen werden konnte. Die aus Tierversuchen und Nachsynthesen vorhandenen Referenzmetaboliten konnten zur Identifizierung mittels Vergleichs- und Mischchromatographie herangezogen werden. Das Ergebnis der Trennung mittels HPLC ist in Tabelle 3-1 zusammengefaßt:

Vergleichssubstanzen	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]	Probe
	Gradientensystem 1	Gradientensystem 2	
AWD 100-041	10,7	9,9	-
Disulfid	12,9	12,5	++
M1	11,5	10,7	+
M3	7,2	6,5	+

Tabelle 3-1: Retentionszeiten von AWD 100-041 und seinen Metaboliten bei der HPLC mit zwei Gradientensystemen

Alle Metaboliten zeigten das gleiche Absorptionsspektrum in Methanol wie AWD 100-041 mit zwei Absorptionsmaxima bei 220 und 311nm und einem Schulterbereich bei 240nm.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden die durch HPLC getrennten Metaboliten und der

Extrakt der Dünnschichtchromatographie unterzogen. Wieder wurden die Vergleichsmetaboliten für Vergleichs- und Cochromatographie genutzt. Da alle Metaboliten eine starke Eigenfluoreszenz mit ähnlicher Farbe und Intensität bei 366nm aufweisen, wurde dies als Detektion genutzt. Für diese Substanzen liegt die Erfassungsgrenze bei 1µg [57].

Das Ergebnis der DC mit zwei Fließmitteln ist in Tabelle 3-2 dargestellt:

Vergleichssubstanzen	R _F -Wert	R _F -Wert	Probe
	Fließmittel 1	Fließmittel 2	
AWD 100-041	0,67	0,67	-
Disulfid	0,54	0,52	++
M1	0,68	0,7	+
M3	0,65	0,5	+

Tabelle 3-2: R_F-Werte von AWD 100-041 und seinen Metaboliten bei der DC mit zwei Fließmittelsystemen

Eine Unterscheidung von AWD 100-041 und M1, die sehr ähnliche R_F-Werte hatten war durch Eintauchen der DC-Platte in eine Nitroprussidnatriumlösung möglich. Dabei färbte sich AWD 100-041 rot, während M1 farblos blieb.

Nach einer Inkubationszeit von 72h auf Hep G2-Kulturen waren weniger als 0,1% AWD 100-041 in der Probe vorhanden. Dies konnte durch Messen der Absorption bei 311nm auf entwickelten HPTLC-Platten mit Hilfe eines CAMAG-Scanners nachgewiesen werden. Da nach einer zellfreien 72-stündigen Inkubation unter gleichen Bedingungen ebenfalls kaum noch AWD 100-041 gefunden werden konnte, statt dessen aber das Disulfid vorlag, konnte davon ausgegangen werden, daß AWD 100-041 nichtenzymatisch dimerisiert. Weitere Artefakte wurden hierbei nicht gefunden, weshalb die gefundenen Metaboliten nach Inkubation mit Hep G2-Zellen enzymatisch entstanden sein mußten.

Abschließend wurde die Identität von M1 und M3 mittels GC/MS bestätigt. Bei M1 konnten der Molekülpeak bei m/z 236 und die Peaks der Fragmente m/z 189 und m/z 163 und der Basispeak m/z 146 gefunden werden. M3 lag nur in sehr geringen Konzentrationen vor, so daß nur der Molekülpeak m/z 268 nachgewiesen werden konnte.

In Tabelle 3-3 sind die entstandenen Fragmente der Metaboliten M1 und M3 aufgelistet. Die dargestellten Fragmentierungsmöglichkeiten bauen auf dem Zerfall von AWD 100-041 auf.

Substanz	nominale Masse	Entstehung
M1	236	M^+
	189	$M-SCH_3$
	163	$M-C_2H_2SCH_3$ (=C)
	146	$C-NH_3$
M3	268	M^+

Tabelle 3-3: Fragmentierung der Metaboliten M1 und M3.

Da AWD 100-041 nach der Inkubationszeit kaum noch nachweisbar war, wurde sein Massenspektrum nicht untersucht. Die wesentlichen Fragmentationen von AWD 100-041 sind in Abbildung 3-2 wiedergegeben [57]

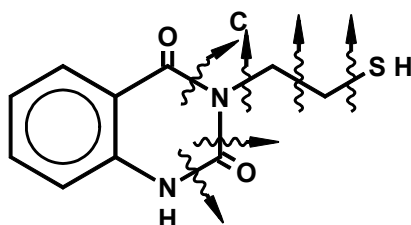


Abbildung 3-2: Wesentliche Fragmentationen von AWD 100-041

3.1.2 Vergleich des Metabolitenspektrums von Hep G2-Zellen mit Versuchen an der Wistar-Ratte

Abbildung 3-3 gibt einen Überblick über die Hauptwege der Biotransformation von AWD 100-041.

Der erste Schritt bei der Metabolisierung von AWD 100-041 durch Hep G2-Zellen scheint die Bildung eines Thioethers oder Dialkylsulfids durch Methylierung des Schwefels durch Thiol-S-Methyltransferasen zu sein (M1). M1 ist auch der Hauptmetabolit bei der Umsetzung von AWD 100-041 durch Hep G2-Zellen. Danach entsteht durch CYP-vermittelte Oxidation von M1 erst ein Sulfoxid (M2) und schließlich ein Sulfon (M3), die in Abbildung 3-3 mit S=O-Doppelbindung formuliert sind. Eine Formulierung von Sulfoxiden und Sulfonen mit semipolarer S^+-O^- -Bindung ist ebenfalls möglich. Allerdings konnte das Sulfoxid bei der Aufklärung der Metaboliten nicht nachgewiesen werden. Es scheint nur ein kurzlebiges Zwischenprodukt bei der ohnehin geringen Bildung von M3 zu sein.

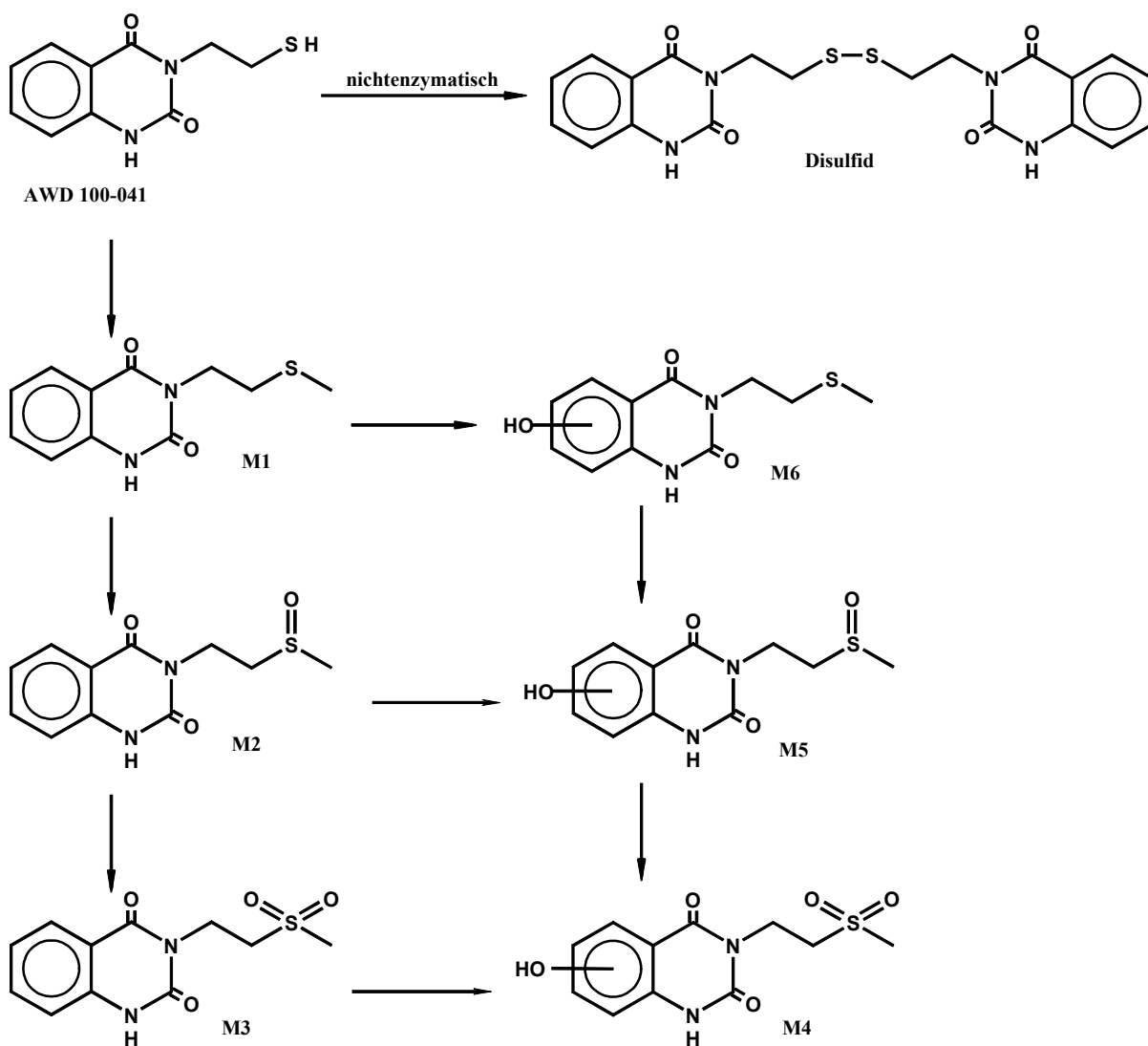


Abbildung 3-3: Hauptwege der Biotransformation von AWD 100-041

Bei der Biotransformation in der Rattenhepatozytenkultur und bei der Leberperfusion [57] entstehen ebenfalls die Metaboliten M1-M3, wobei hier, im Gegensatz zu den Hep G2-Kulturen, M2 der Hauptmetabolit ist und M1 nur in geringen Mengen bestehen bleibt. Des weiteren entstehen die Metaboliten M4-M6 durch Hydroxylierung des Aromaten. Dies findet bei Hep G2-Kulturen anscheinend nicht statt. Die Metaboliten, vor allem M6, treten auch als Konjugate auf, während bei Hep G2-Zellen durch fehlende Hydroxylierung keine Konjugate gefunden werden konnten.

Bei Versuchen an der Ratte mit anschließender Bestimmung von Metaboliten in Harn und Kot konnte AWD 100-041 und das Disulfid nur noch in Spuren nachgewiesen werden. Hauptmetaboliten waren M2 und M3, sowie M4 und M6, die auch konjugiert vorlagen. Außerdem konnte noch ein weiteres, am Aromaten zweifach hydroxyliertes Dialkylsulfid nachgewiesen werden [57].

3.2 AR 12463

AR 12463 (5-Piperidino-7-[N-pentyl-(β -hydroxyethyl)]amin-s-triazolo[1,5-a]pyrimidin) ist ein Derivat des Arzneistoffes Trepidil (Rocornal®). Die Strukturformel ist in Abbildung 3-4 abgebildet.

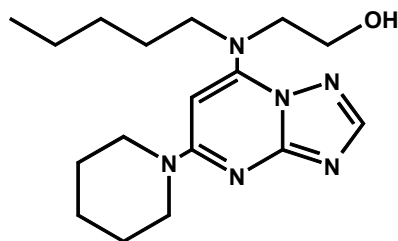


Abbildung 3-4: AR 12463

Triazolopyrimidine wie Trepidil haben eine vasodilatierende Wirkung, hemmen die Thrombozytenaggregation, steigern dosisabhängig die Diurese, führen zu Bronchodilatation und wirken positiv inotrop [18, 44, 47, 76]. AR 12463, zeigt zwar keine positiv inotrope Wirkung, ist aber antiarrhythmisch wirksam [74]. Die Thrombozytenaggregationshemmung beruht auf einer Erhöhung der Prostacyclinsynthese, eine konzentrationsabhängige Hemmung der Thromboxansynthese und der Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus Thrombozyten [9, 10, 43]. Des weiteren konnte im Tierversuch eine Senkung des als Artheroskleroseindex verwendeten Quotienten Gesamtcholesterol/ HDL-Cholesterol nachgewiesen werden [6].

3.2.1 Aufklärung der durch Hep G2-Kulturen gebildeten Metaboliten

Zur Gewinnung von Metaboliten wurden die Hep G2-Kulturen mit AR 12463-haltigem Medium 72h inkubiert. Durch Vorversuche konnte beobachtet werden, daß unbehandelte Hep G2-Kulturen keine zur Isolation ausreichende Metabolitenmenge bildeten, weshalb PB-behandelte Hep G2-Zellen herangezogen wurden.

Zur Isolierung der Metaboliten von AR 12463, wurde das Kulturmedium bei basischem pH mit einer Chloroform/ Isopropanol-Mischung extrahiert. Um die bei Vorversuchen ermittelten Konjugate zu erfassen, wurde die wäßrige Phase anschließend mit Glucuronidase und Sulfatase behandelt und dann wieder extrahiert. Die eingengt und in Methanol aufgenommenen Extrakte wurden mittels HPLC aufgetrennt, wobei gleichzeitig ein Spektrum der Metaboliten aufgenommen wurde. Mit Hilfe von Vergleichsubstanzen konnten die Metaboliten durch Vergleichs- und Cochromatographie identifiziert werden. Die Ergebnisse der HPLC-Trennung sind in Tabelle 3-4 dargestellt:

Vergleichs- substanz	Retentionszeit	Retentionszeit	Absorptions- maxima [nm]	Probe
	[min] Gradientensystem 1	[min] Gradientensystem 2		
AR 12463	13,3	13,9	250, 285	++
M1	7,3	7	248, 287	-
M3	7,7	9,2	260	+
M4	11,1	10,3	250, 285	+
M5	11,6	11	249, 287	-
M7	11,9	11,3	249, 283	+

Tabelle 3-4: Retentionszeiten von AR 12463 und seinen Metaboliten bei der HPLC mit zwei Gradientensystemen

AR 12463 und M4 konnten auch in der Konjugatfraktion gefunden werden.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden die aufgetrennten Metabolite der DC unterzogen. Wieder wurde mit den Vergleichssubstanzen Vergleichs- und Cochromatographie durchgeführt. Detektiert wurde mit Hilfe der Fluoreszenzlöschung auf mit Fluoreszenzindikator imprägnierten DC-Kieselgelplatten bei 254nm, wobei die Nachweisgrenze bei ca. 1µg für AR 12463 liegt [57]. Die Ergebnisse für zwei Fließmittelsysteme sind in Tabelle 3-5 zusammengetragen:

Vergleichssubstanz	R _F -Wert	R _F -Wert	Probe	Probe
	Fließmittel 1	Fließmittel 2		Konjugatfraktion
AR 12463	0,78	0,8	++	+
M1	0,35	0,48	-	-
M3	0,8	0,7	+	-
M4	0,6	0,68	+	+
M5	0,55	0,64	-	-
M7	0,7	0,84	+	-

Tabelle 3-5: R_F-Werte von Ar 12463 und seinen Metaboliten bei der DC mit zwei Fließmittelsystemen

Abschließend wurden die gefundenen Metaboliten mit MS auf ihre Identität geprüft. M4, der Hauptmetabolit und M7 konnten aufgrund ihrer Fragmentierung bestätigt werden. M3 lag in zu geringen Konzentrationen vor, um verlässliche Ergebnisse erhalten zu können.

In Tabelle 3-6 sind die bei der MS gefundenen Fragmente von AR 12463 und den Metaboliten M4 und M7 aufgelistet. Abbildung 3-5 zeigt die Fragmentierung von AR 12463.

Substanz	nominale Masse	Entstehung
AR 12463	332	M^+
	314	$M-H_2O (= A)$
	303	$M-C_2H_5 (= B)$
	288	$M-CH_2CH_2O$
	287	$M-CH_2CH_2OH$
	285	$A-C_2H_5$
	273	$M-CH_2O-C_2H_5$
	258	$C-C_3H_7$
	249	$M-C_5H_{10}N(+H)$
	245	$A-C_5H_{10}(+H)$
	231	$C-C_5H_{10}$
	84	$C_5H_{10}N$
M4	348	M^+
	319	B
	275	$B-CH_2CH_2O$
	84	$C_5H_{10}N$
M7	346	M^+
	289	$M-C_3H_5O$
	285	$A-CH_3CO$
	245	$C-C_3H_7O$
	84	$C_5H_{10}N$

Tabelle 3-6: Fragmentierung von AR 12364 und seinen Metaboliten M4 und M7 [57]

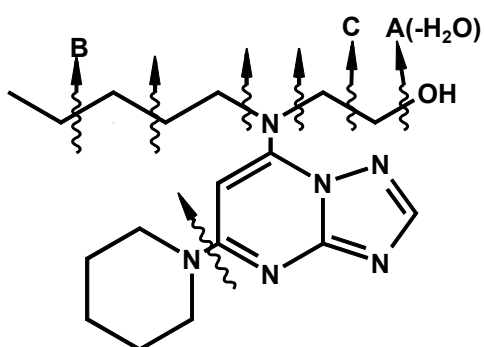


Abbildung 3-5: Fragmentierung von AR 12463 in der MS

3.2.2 Vergleich des Metabolitenspektrums von Hep G2-Zellen mit Versuchen an der Wistar-Ratte

Einen Überblick über die Hauptwege der Metabolisierung von AR 12463 gibt Abbildung 3-6.

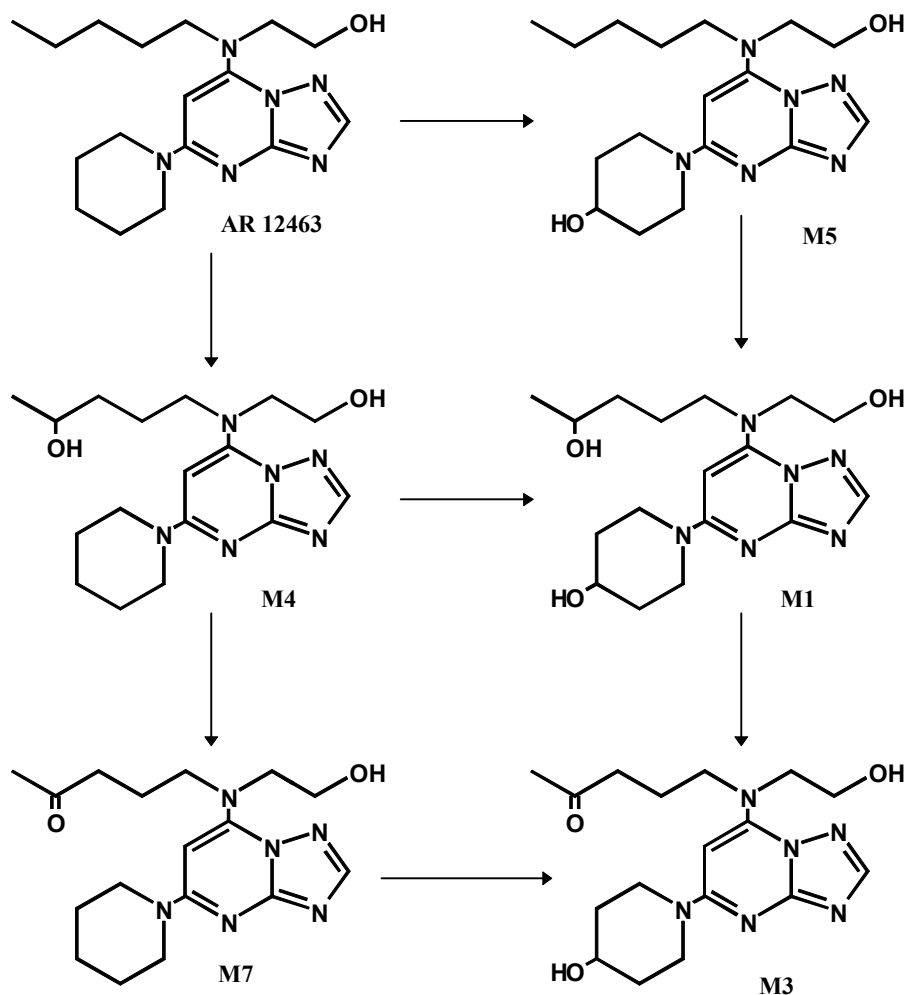


Abbildung 3-6: Hauptwege der Biotransformation von AR 12463

AR 12463 wurde nur gering von Hep G2-Kulturen metabolisiert. Erst nach Behandlung der Zellen mit PB konnte eine Metabolitenkonzentration erreicht werden, die auswertbar war.

Hauptmetabolit von AR 12463, gebildet durch Hep G2-Zellen ist M4, der durch CYP-vermittelte Einführung einer Hydroxylgruppe an die Pentylseitenkette entsteht. Daran schließt sich die Oxidation der Hydroxylgruppe, möglicherweise durch Dehydrierung durch Alkoholdehydrogenasen [57], zum Keton an. Dieser Metabolit (M7) entsteht aber in geringeren Mengen. Von M4 und AR 12463 konnten auch Konjugate nachgewiesen werden. M7 wurde anscheinend nicht oder in nicht nachweisbaren Mengen konjugiert, was durch seine geringere Konzentration begründet sein könnte. Der Metabolit M3, mit einer Hydroxylgruppe am Piperidinring und einer

Ketogruppe in der Pentylseitenkette, konnte nur im Gesamtextrakt über die HPLC und DC nachgewiesen werden. In der isolierten Fraktion, die durch HPLC Trennung gewonnen wurde, war die Konzentration zu gering, um über MS nachgewiesen werden zu können. Die Bildung von M3 würde voraussetzen, daß zuvor der Metabolit M1 entstanden wäre. Dieser, mit einer Hydroxylgruppe am Piperidinring und in der Pentylseitenkette, kann wiederum aus M4 entstehen. Daß der Piperidinring zuerst hydroxyliert wird (M5) ist auch möglich, stellt aber in Rattenhepatozyten nur ein Nebenweg dar [57].

Bei Rattenhepatozytenkulturen sind die Hauptmetaboliten, wie auch bei der Leberperfusion, M5 und M4. Des weiteren werden die Metaboliten M3 und M7 gebildet. M3 wird noch weiter transformiert durch Bildung einer Ketogruppe und Einführen einer Doppelbindung am Piperidinring. M1 konnte nur nach Kurzzeitinkubation nachgewiesen werden. Danach wurde es zu M3 verstoffwechselt. Als Konjugate traten vor allem M1, M4 und M5 auf. AR 12463 und M7 wurden kaum konjugiert, traten aber auch nur in geringen Mengen auf [57]. Insgesamt wurden bei der Rattenhepatozytenkultur 0,4mg AR 12463 pro 10^6 Zellen umgesetzt, während es bei Hep G2-Kulturen nur 0,014mg nach PB-Induktion waren.

3.3 FLM 5011

2-Hydroxy-5-methylauropheon-oxim (FLM 5011), in Abbildung 3-7 dargestellt, ist ein 5-Lipoxygenasehemmstoff mit antiphlogistischer, antiasthmatischer, antiinflammatorischer, antiproliferativer und cardioprotektiver Wirkung. Seine Toxizität ist gering. Der Einfluß von FLM 5011 auf verschiedene Entzündungsprozesse und anaphylaktische Prozesse in vivo konnte anhand des Carrageeninödems der Rattenpfote, des UV-B-Erythems in Meerschweinchen, des Ovalbumin-induzierten allergischen Asthmas beim Meer-schweinchen und der Myokarditis gezeigt werden [90].

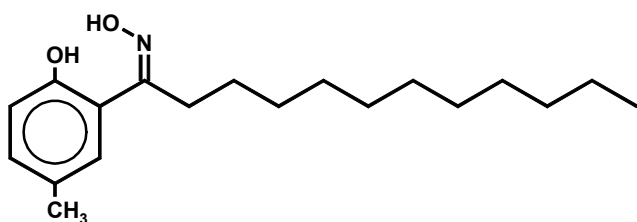


Abbildung 3-7: FLM 5011

Bei Untersuchungen zur Pharmakokinetik konnte gezeigt werden, daß die schlecht wasserlösliche Substanz peroral als Suspension kaum absorbiert wird. Nachweisbare Blutspiegel konnten erst nach Lösen der Substanz in Erdnußöl gefunden werden. Nach

schnellem Anfluten konnte FLM 5011 vor allem in der Dünndarmwand, in der Magenwand, in Leber, Herz und Lunge gefunden werden [90].

FLM 5011 wird in der Leber über den Abbauweg der Fettsäuren durch ω - und β -Oxidation metabolisiert. Die Metaboliten, die bei der ω -Oxidation entstehen haben eine stärkere inhibitorische Wirkung auf die Lipoxxygenase als FLM 5011.

Die Wirksamkeit von FLM 5011 entsteht wahrscheinlich durch eine Interaktion von Hydroxam-, Oxim- oder Hydroxylaminstruktur in Nachbarschaft zum aromatischen System mit dem Radikalzentrum des Enzyms. Dieses ist für die Wasserstoffabspaltung bei der Oxidation der Arachidonsäure verantwortlich. Auch eine Wechselwirkung mit dem Non-Häm-Eisen im katalytischen Zentrum der Lipoxxygenase ist möglich [57]. Zusätzlich wird die Lipoxxygenase durch Binden des Laurinsäurerestes von FLM 5011 an die hydrophobe Region gehemmt.

Die aus Membranlipiden durch Phospholipase A₂ freigesetzte Arachidonsäure kann durch Cyclooxygenasen zu Prostaglandinen oder durch Lipoxxygenasen zu Leukotrienen umgesetzt werden. Die 5-Lipoxxygenase führt zu einer Hydroperoxidstruktur am C-Atom 5 der Arachidonsäure. Durch Umlagerung dieser 5-Hydroperoxyeikosatetraensäure (5-HPETE) entsteht das Leukotrien A₄, welches zu den Leukotrienen B₄, C₄, D₄ und E₄ umgewandelt werden kann. Des weiteren entsteht 5(S)-Hydroxyeikosatetraensäure (5(S)-HETE).

Die Leukotriene A₄, C₄, D₄ und E₄ gehören zu den stärksten Konstriktoren der Bronchialmuskulatur und spielen eine entscheidende Rolle bei Asthmaanfällen. Auch bei Entzündungen sind sie durch Erhöhen der Kapillarpermeabilität und durch Förderung von Ödembildung beteiligt. Leukotrien B₄ ist vermutlich an der Wanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe mit verantwortlich. Außer der 5-Lipoxxygenase konnten in verschiedenen Geweben auch 12- und 15-Lipoxxygenasen nachgewiesen werden. Die biologische Bedeutung der entstandenen Arachidonsäurederivate 12- und 15-HPETE ist noch relativ wenig bekannt [66].

3.3.1 Aufklärung der durch Hep G2-Kulturen gebildeten Metaboliten

Zur Gewinnung von Metaboliten wurden Hep G2-Zellen 72h mit FLM 5011-haltigem Kulturmedium inkubiert. FLM 5011 und seine Metaboliten wurden sowohl vor als auch nach Konjugatspaltung mit einer Chloroform/ Isopropanol-Mischung aus der wäßrigen Phase extrahiert. Da die Metaboliten eine Carbonsäuregruppe, sowie eine phenolische OH-Gruppe besitzen, war eine Bildung von Konjugaten zu erwarten. Die Chloroformphase wurde eingeengt und das Extrakt in Methanol aufgenommen. Die Metaboliten wurden mit Hilfe von HPLC und Verwendung von bereits vorhandenen Vergleichsmetaboliten für Vergleichs- und Cochromatographie, aufgetrennt und isoliert. Die Nachweisgrenze für FLM 5011 lag bei 1-5 μ g [57]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-7 zusammengefaßt.

Vergleichs- substanzen	Retentionszeit [min] Gradientensystem 1	Retentionszeit [min] Gradientensystem 2	Absorptions- maxima [nm]	Probe
FLM 5011	17	18,9	216, 256, 312	+++
FLM 5011 Keton	20,5	22,3	216, 256, 334	++
M2 Oxim	13,8	6,8	218, 256, 312	+
M2 Keton	14,4	8,8	214, 256, 336	+
M4	3,3	3,7	217, 255, 334	+

Tabelle 3-7: Retentionszeiten von FLM 5011 und seinen Metaboliten bei der HPLC mit zwei Gradientensystemen

Alle Metaboliten sowie FLM 5011 konnten auch in der Fraktion der Konjugate gefunden werden. Da FLM 5011 auch konjugiert vorlag, wurde anscheinend die Carbonsäuregruppe und die phenolische OH-Gruppe konjugiert.

Des weiteren wurden die gefundenen Metaboliten als auch das Extrakt für die DC herangezogen. Wiederum wurden Vergleichs- und Cochromatographie mit den Vergleichs-metaboliten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-8 aufgeführt.

Vergleichs- substanz	R _F -Wert Fließmittel 1	R _F -Wert Fließmittel 2	R _F -Wert Fließmittel 3	Fluoreszenz bei 366nm	Probe
FLM 5011	0,61	0,74	0,38	blaugrau	+++
FLM 5011 Keton	0,86	0,81	0,73	braun	++
M2 Oxim	0,1	0,76	0,6	blaugrau	+
M2 Keton	0,122	0,78	0,66	braun	+
M4 Keton	0,69	0,71	0,54	braun	+

Tabelle 3-8: R_F-Werte von FLM 5011 und seinen Metaboliten bei der DC mit drei Fließ-mittelsystemen

Detektiert wurden die Substanzen über Fluoreszenzlöschung. Da sie auch eine Eigenfluoreszenz besitzen, konnten sie ebenfalls über ihre Fluoreszenz bei 366nm erkannt werden. Ein Eintauchen der DC-Platte in eine FeCl₃-Lösung ergab bei den Oximen eine violettschwarze Färbung und bei den Ketonen eine gelbe Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 366nm.

Zur Erhärtung der Ergebnisse wurden die gewonnenen Metaboliten mittels MS identifiziert.

Substanz	nominale Masse	Entstehung
FLM 5011	305	M ⁺
	288	M-OH (=A)
	216	A-C ₅ H ₁₂ (=B)
	202	B-CH ₂
	165	M-C ₁₀ H ₂₀ (=C)
	162	A-C ₉ H ₁₈
	147	C-H ₂ O (=D)
	133	D-CH ₂
	121	D-CN
FLM 5011 Keton	290	M ⁺
	272	M-H ₂ O (=A)
	187	A-C ₆ H ₁₃ (=B)
	163	M-C ₉ H ₁₂
	150	M-C ₁₀ H ₂₀
	135	M-C ₁₁ H ₂₃
M2 Oxim	281	M ⁺
	263	M-H ₂ O
	237	M-CO ₂
	160	C ₁₀ H ₁₀ NO
	147	C-H ₂ O
	133	D-CH ₂
M2 Keton	264	M ⁺
	163	M-C ₇ H ₁₇
	150	M-C ₈ H ₁₈
	135	M-C ₉ H ₂₁
M4 Keton	208	M ⁺
	190	M-H ₂ O
	135	C ₈ H ₇ O ₂

Tabelle 3-9: Fragmentierung von FLM 5011 und seinen Metaboliten

Da die Fragmentierung der Oximmetaboliten auf die Fragmentierung von FLM 5011 zurückgeht und die der Ketone auf das FLM 5011 Keton, ist in Abbildung 3-8 die wesentliche Fragmentation von FLM 5011 und dem FLM 5011 Keton dargestellt.

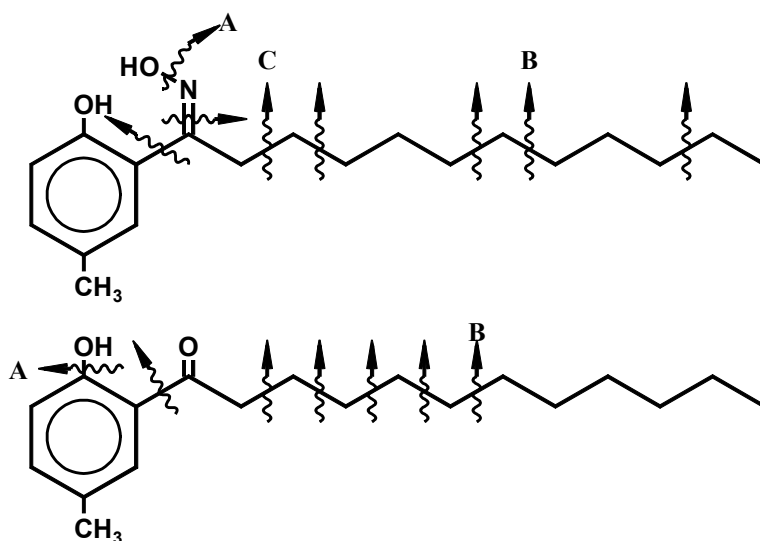


Abbildung 3-8: Wesentliche Fragmentationen von FLM 5011 (oben) und FLM 5011 Keton (unten)

3.3.2 Vergleich des Metabolitenspektrums von Hep G2-Zellen mit Versuchen an der Wistar-Ratte

FLM 5011 unterliegt dem typischen Abbau einer Fettsäure. Damit die Seitenkette abgebaut werden kann, muß sie in ω -Stellung hydroxyliert werden, welches wahrscheinlich wie bei der Laurinsäure-Hydroxylierung durch CYP 4 A-Isoenzyme katalysiert wird (siehe 2.3.4). Dieser Metabolit wird schnell zur Carboxyverbindung oxidiert, die ebenfalls sehr kurzlebig ist. Anschließend kann der Abbau der Seitenkette durch β -Oxidation einsetzen, wobei schrittweise C_2 -Fragmente abgespalten werden [57]. Die Biotransformation der Oximgruppe erfolgt durch Aldehydoxidasen [105]. Dabei entsteht zuerst ein Imin, das anschließend nach Wasseranlagerung und Ammoniakabspaltung zu einem Keton wird.

Die wichtigsten Metaboliten sind in Abbildung 3-9 dargestellt.

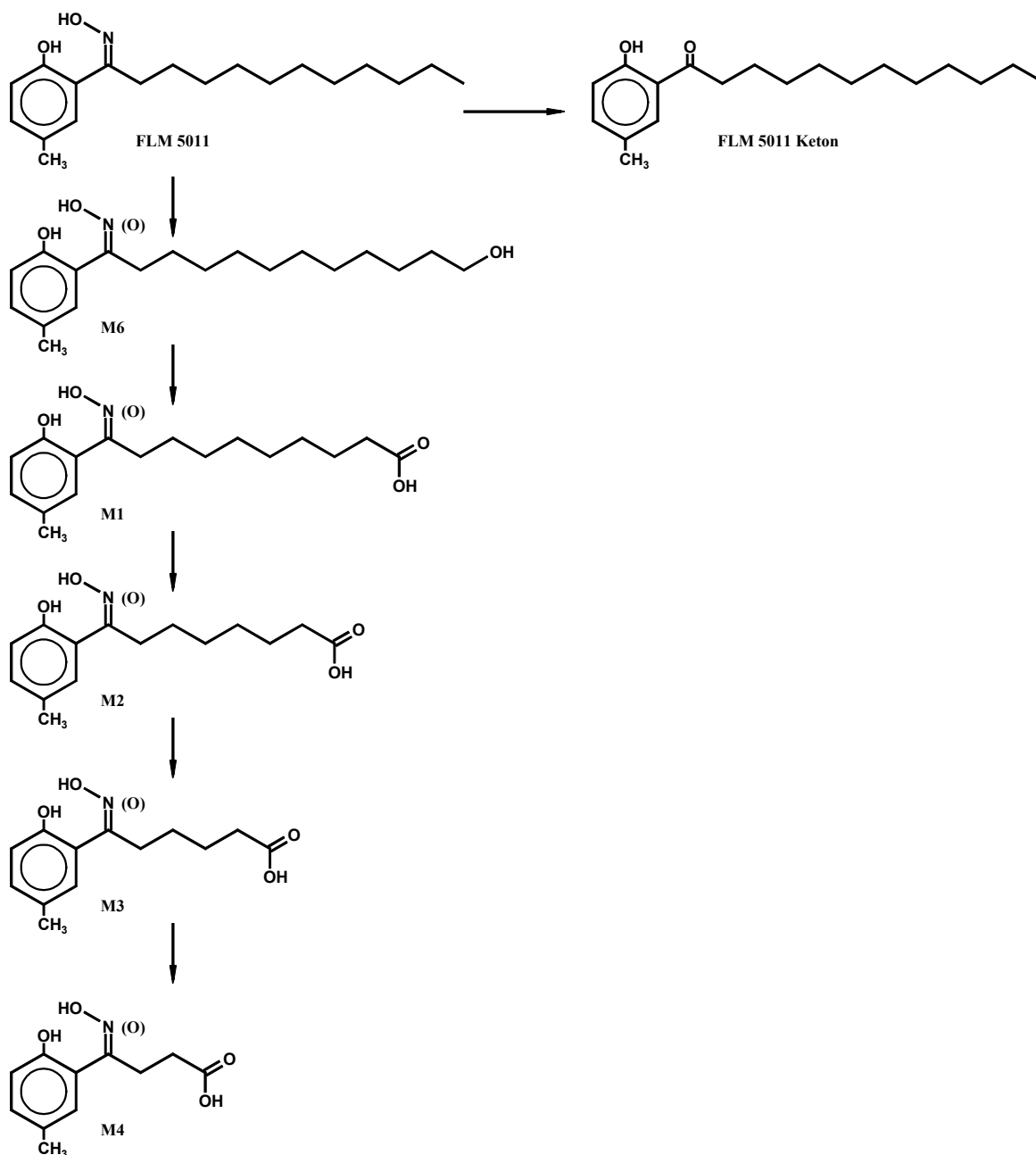


Abbildung 3-9: Hauptwege der Biotransformation von FLM 5011

In Urin und Faeces der Ratte, sowie in Rattenhepatozytenkulturen konnten hohe Konzentrationen von Metaboliten von FLM 5011 gefunden werden [60]. In Hep G2-Kulturen wurde ein Umsatz von 0,049mg FLM 5011 pro 10^6 Zellen beobachtet. Die Hauptmetaboliten in der Hepatozytenkultur M2, M3 und M4 sind auch die Hauptmetaboliten im Urin der Ratte und im Urin des Menschen [90]. M2 und M4 konnten ebenfalls als Hauptmetaboliten, vor allem ihre Ketoformen, in Hep G2-Kulturen gefunden werden. Da M3 ein Zwischenprodukt bei der Bildung von M4 aus M2 ist, müßte es ebenfalls entstanden sein, wahrscheinlich wurde es aber zu schnell abgebaut und lag somit in Konzentrationen vor, die nicht detektierbar waren. Alle durch Hep G2-

Zellen gebildeten Metaboliten traten auch als Konjugate auf. Da auch FLM 5011 und sein Keton konjugiert wurden, ist es wahrscheinlich, daß vor allem an der phenolischen Hydroxylgruppe glucuronidiert und auch sulfatiert wurde. Eine Konjugation an den Carboxylgruppen der Metaboliten ist ebenfalls möglich. Aminosäurekonjugate, wie sie bei der Ratte gefunden wurden [57], konnten nicht festgestellt werden. Ebenfalls konnten auch die ω -Hydroxy- und die Iminverbindung von FLM 5011 nicht gefunden werden. Diese traten bei Kurzzeitinkubationen von FLM 5011 auf Rattenhepatozytenkulturen auf. Da dies auch Intermediärprodukte bei der Bildung anderer Metaboliten sind, wurden sie bei einer Inkubationszeit von 72h auf Hep G2-Zellen wahrscheinlich schon verstoffwechselt.

4 Zytotoxizitäts- und Proliferationsuntersuchungen mit Hilfe von Hep G2-Zellen

4.1 Proliferation und Zytotoxizität

4.1.1 Die Testsysteme

Für Zytotoxizitäts- oder Proliferationsuntersuchungen an Zellen in Kulturen ist ein direktes Zählen der Zellen mit Hilfe eines Mikroskops oder mit einem elektronischen Zellzähler nicht immer geeignet. Deshalb wurden diese Methoden häufig durch indirekte Methoden ersetzt. Dabei werden bestimmte Komponenten der Zellen, wie DNA- und Proteingehalt, die Aktivität bestimmter Enzyme, die zelluläre Aufnahme von Farbstoffen oder fluoreszierenden Stoffen oder auch die Radioaktivität von Zellen nach Einbau eines Nukleotid-“labels“, bestimmt. Es werden also Parameter charakterisiert, die auch Indikatoren für überlebensnotwendige Zellfunktionen sind. Dazu gehören Zellteilung und Wachstum, Proteinsynthese und Proteingehalt, Anhaftungs- und Ablöseverhalten, Sauerstoffverbrauch, Membranintegrität und Energieverbrauch.

Die Testsysteme können in zwei Hauptklassen unterteilt werden: die Schnelltests oder auch Kurzzeittests, bei denen die Membranpermeabilität oder eine Stoffwechselveränderung bestimmt wird, und die Langzeittests, bei denen die Überlebensrate oder der Erhalt der Reproduktionskapazität von Zellen über Zellzahl, Proteingehalt oder DNA-Gehalt bestimmt wird. Effekte auf den Stoffwechsel oder die Vitalität einer Zelle können reversibel sein. Um einen irreversiblen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen nachzuweisen, müssen die Kulturen nach der Inkubation mit der entsprechenden Substanz in Abwesenheit der Substanz weiter kultiviert werden. Dies kann z.B. mit dem Test auf Plattiereffizienz quantifiziert werden, bei dem Zellen 24h mit der Substanz inkubiert und dann trypsiniert werden. Nach mehreren Tagen können dann die gebildeten Zellkolonien ausgezählt werden [34].

4.1.1.1 Der LDH Test

Der Zelltod wird häufig über die Quantifizierung der Membranschädigung bestimmt. Oft werden die Aufnahme oder die Exklusion von Farbstoffen, wie z.B. Trypanblau oder Ethidiumbromid, genutzt oder das Abgeben von radioaktiven Isotopen z.B. [³H]-Prolin oder -Thymidin. Die dritte Möglichkeit ist das Bestimmen von zytosolischen Enzymen im Kulturmedium, die aus geschädigten Zellen diffundieren können, wobei die Enzymaktivität direkt proportional zur Zahl der lysierten Zellen ist. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles, im Zytoplasma aller

Zellen vorkommendes Enzym, das bei Zellschädigung schnell in das Kulturmedium abgegeben wird. Die Enzymaktivität der LDH wurde mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kits von Boehringer Mannheim bestimmt.

Im ersten Schritt wird Laktat durch die freigesetzte Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, während NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden zwei Wasserstoffatome von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) transferiert und es entsteht das rote Formazan Salz. Hierbei wird Diaphorase als Katalysator eingesetzt.

Da für den Test nur $0,2 \cdot 10^4$ Zellen notwendig sind, kann er arbeitserleichternd in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Da fetales Kälberserum auch LDH enthält, ist es unbedingt notwendig immer eine Mediumblindprobe mitzuführen. Auch die getesteten Substanzen können einen Einfluß auf die LDH- oder die Diaphorase-Aktivität haben und sie beispielsweise hemmen, weshalb auch hier das Mitführen einer zusätzlichen Kontrolle erforderlich ist. Des weiteren wurde die LDH-Aktivität in unbehandelten Kulturen und in mit 1% Triton X 100 behandelten Kulturen überprüft, um die minimale, spontane und die maximal mögliche LDH-Freisetzung der Zellen zu bestimmen.

Das Prinzip der Bestimmung der LDH-Aktivität ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

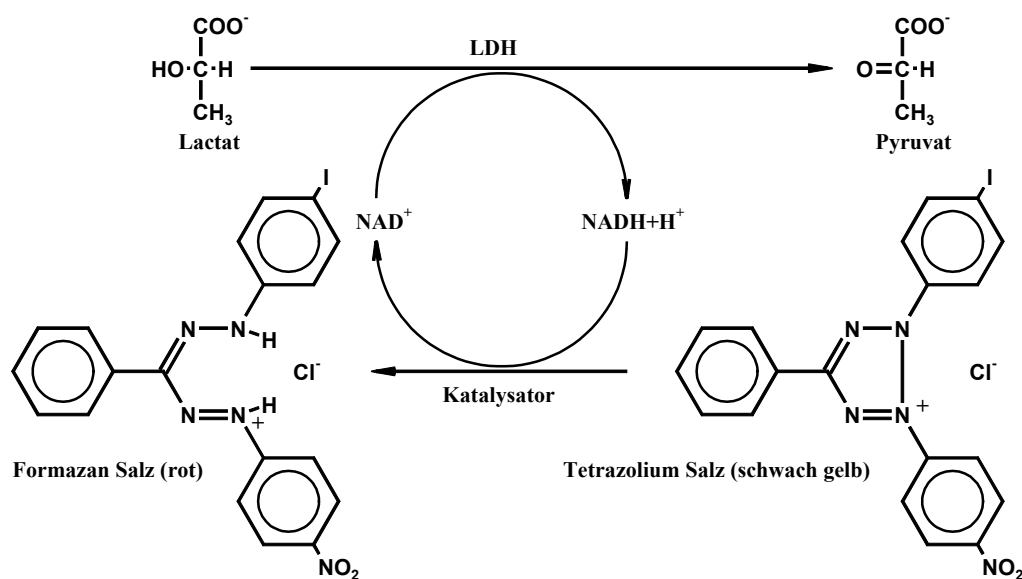


Abbildung 4-1: Bestimmung der LDH

4.1.1.2 Bestimmung des DNA-Gehalts mit bisBenzimid

Neben der Zellzahl sind die Bestimmung von DNA- und Proteingehalt die gebräuchlichsten Meßwerte bei der Quantifizierung von zellulärem Material. Die DNA kann durch ihre Absorption bei 260nm bestimmt werden, wobei aber viele Zellbestandteile, z.B. Proteine stören. Deshalb ist diese Methode nur für gereinigte DNA geeignet. Bisbenzimid (Hoechst 33258, 2'-4[Hydroxyphenyl]-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bis-1H-benzimidazol) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich selektiv in Adenin/ Thymin-reichen Regionen der DNA anlagert. Es findet dabei jedoch keine Interkalation in die DNA-Doppelhelix statt. Die Quantifizierung des DNA-Gehalts von Zellen mit bisBenzimid beruht auf der Zunahme der Fluoreszenzemission von bisBenzimid bei 458nm infolge der Wechselwirkung des Farbstoffs mit der DNA. Dies wird bei pH 7,4 und bei hoher Salzkonzentration, bei der das Chromatinprotein dissoziiert, durchgeführt. Vorher ist ein Zellaufschluß durch Behandlung mit Ultraschall oder durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Kulturen notwendig. Diese Methode gestattet einen Nachweis von 10ng/ml und erfordert eine doppelsträngige DNA [56].

Bei der Bestimmung des DNA-Gehalts wird die DNA von allen Zellen bestimmt, die adherent sind. Geschädigte oder tote Zellen, die sich nicht vom Substrat gelöst haben werden mitbestimmt. Der DNA-Gehalt in einer Zelle ist annähernd konstant, weshalb durch Bestimmung des DNA-Gehalts direkt auf die Zellzahl geschlossen werden kann. Im Hinblick auf das Proliferationsverhalten von Hep G2-Zellen, dargestellt in Abbildung 2-3, wurde ein DNA-Gehalt von 85% nach einer Inkubation mit einer Substanz über 24h so bewertet, daß kein Wachstum stattgefunden hat. Prozentzahlen darunter weisen auf Zelltod hin. Bei Werten zwischen 85% und 100% hatte zwar Wachstum stattgefunden, dieses wurde aber gehemmt. Für Inkubationszeiten von 72h lag dieser Grenzwert bei 65%.

4.1.1.3 Bestimmung des Proteingehalts mit Amidoschwarz

Das Anfärben von Zellproteinen mit Amidoschwarz 10B kann für Tests der Proliferation, der Zytotoxizität, für die Bestimmung adherenter Zellen und zur Quantifizierung der Zellzahl herangezogen werden. Doch ist das Verhältnis von Proteingehalt zu DNA-Gehalt nur unter standardisierten Bedingungen in einer Zelle bzw. in einer Zellkultur konstant. Ansonsten können Proteingehalt bzw. RNA-Gehalt einer Zelle beträchtlichen Schwankungen unterworfen sein, weshalb die Nutzung der Proteinbestimmung zur Quantifizierung der Zellzahl fraglich ist.

Zur Bestimmung des Proteingehalts mittels Amidoschwarz 10B werden die Zellen mit Formaldehyd fixiert, nicht adherente Zellen entfernt und die adherenten Zellen mit Amidoschwarz bei saurem pH inkubiert. Dabei bindet der Farbstoff an den Amidostickstoff des Proteins. Proteingebundener Farbstoff kann danach vollständig mit NaOH eluiert werden und mit Hilfe

eines Mikrotiterplatten-Photometers photometrisch vermessen werden. Eine Linearität zwischen Zellzahl und Absorption war in einem Bereich von 1000-64000 Zellen pro well gewährleistet, was bei der Validierung dieses Tests mit Hilfe von HaCaT-Zellen festgestellt wurde [91].

Das Anfärben von Zellproteinen ermöglicht eine Detektion sowohl von zytostatischen als auch zytolytischen Effekten toxischer Substanzen, wenn die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie bekannt ist. Eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen ist nicht möglich. Da aber bei adherent wachsenden Zellen sich unter den meisten Kulturbedingungen tote Zellen vom Substrat lösen, kann davon ausgegangen werden, daß die bestimmten Proteine von lebenden Zellen stammen. Zellen die also geschädigt oder schon tot sind und sich nicht vom Substrat gelöst haben, werden bei dem Amidoschwarz-Assay mitbestimmt [91].

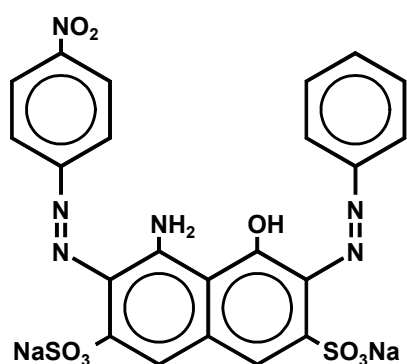


Abbildung 4-2: Amidoschwarz 10B

4.1.2 Die Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden die Arzneistoffe AWD 100-041, AR 12463 und FLM 5011, deren Metabolitenspektrum in vitro aufgeklärt wurden, herangezogen, da schon bei der Inkubation Veränderungen an den Kulturen aufgefallen waren. Als weiteres Arzneimittel wurde ein Mazerat des Krautes von *Solanum lycopersicon* eingesetzt. Die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von *Solanum lycopersicon*-Mazeraten im Vergleich mit den Hauptalkaloiden Tomatin und Tomatidin entsprang einer Zusammenarbeit mit dem Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe.

Des weiteren wurden die Induktoren 3-MC, PB und Clofibrat getestet, um den Einfluß vor allem auf den Proteingehalt in Hep G2-Kultur besser beurteilen zu können. Da DMSO häufig als Lösungsmittel für schwer lösliche Substanzen eingesetzt wurde, mußte es getestet werden, um für verschiedene DMSO-Konzentrationen Vergleichswerte zu haben. Auch andere Lösungsmittel, wie Ethanol und Methanol, wurden überblickshalber auf ihren Einfluß auf das Proliferationsverhalten von Hep G2-Kulturen überprüft.

4.1.2.1 AWD 100-041

Die Ergebnisse der Proliferations- und Toxizitätsuntersuchungen von AWD 100-041 an Hep G2-Kulturen sind in Abbildung 4-3 dargestellt.

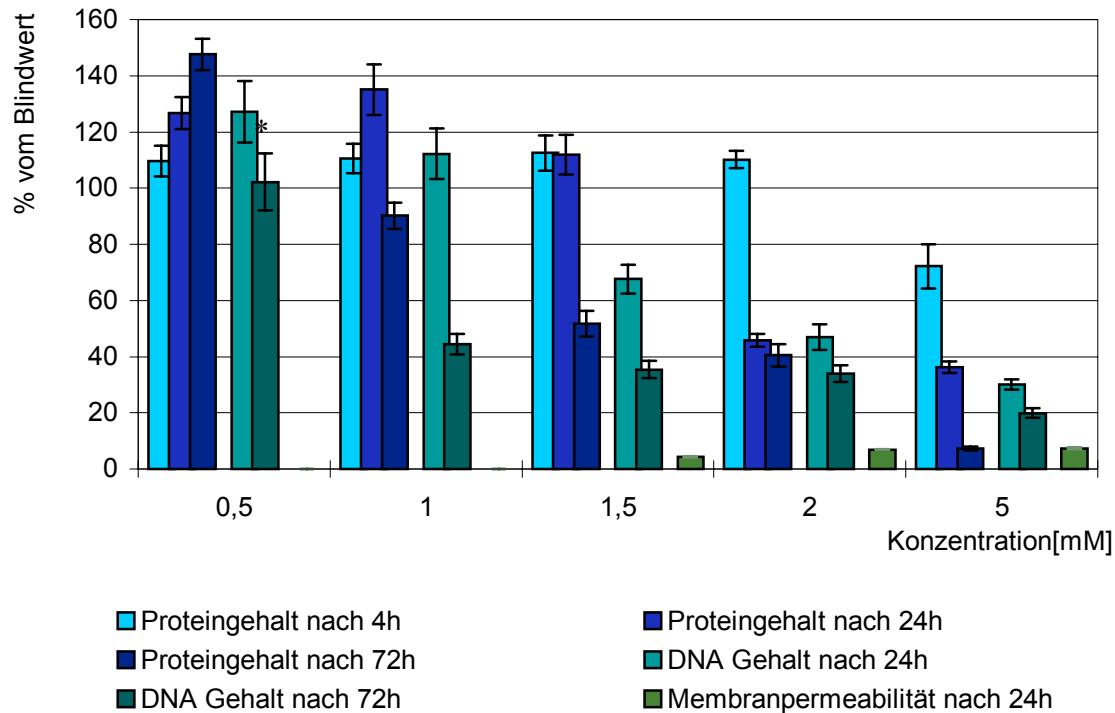


Abbildung 4-3: Einfluß von AWD 100-041 auf den Protein- und DNA-Gehalt sowie auf die Membranpermeabilität von Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,05$, * kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

AWD 100-041 steigerte in einer Konzentration von 0,5mM die Proliferation und die Proteinsynthese. Bei steigender Konzentration nahm dieser Effekt rasch ab und bei einer Inkubationszeit von 72h war schon ab 1mM AWD 100-041 ein starker toxischer Effekt zu beobachten, während eine Inkubationszeit von 4h kaum Einfluß auf die Hep G2-Kultur zeigte. Der Proteingehalt war nach 24h immer noch bei einer Konzentration von 1,5mM gegenüber dem DNA-Gehalt erhöht, obwohl schon ein Absterben der Zellen begonnen hatte. Dies könnte auf eine Hypertrophie der überlebenden Zellen zurückzuführen sein. Bei höheren Konzentrationen korrelierte der Proteingehalt wieder mit dem DNA-Gehalt der Kulturen. Die durch Kurvenanpassung ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 4-1 zusammengetragen.

Inkubationszeit [h]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über Proteingehalt [mM]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über DNA-Gehalt [mM]
24	1,97	1,93
72	1,5	0,96

Tabelle 4-1: IC₅₀-Werte von AWD 100-041

Der Einfluß von AWD 100-041 auf die Membranintegrität von Hep G2-Zellen war nur geringfügig.

4.1.2.2 AR 12463

Die Ergebnisse der Proliferations- und Toxizitätsuntersuchungen mit AR 12463 an Hep G2-Kulturen sind in Abbildung 4-4 dargestellt.

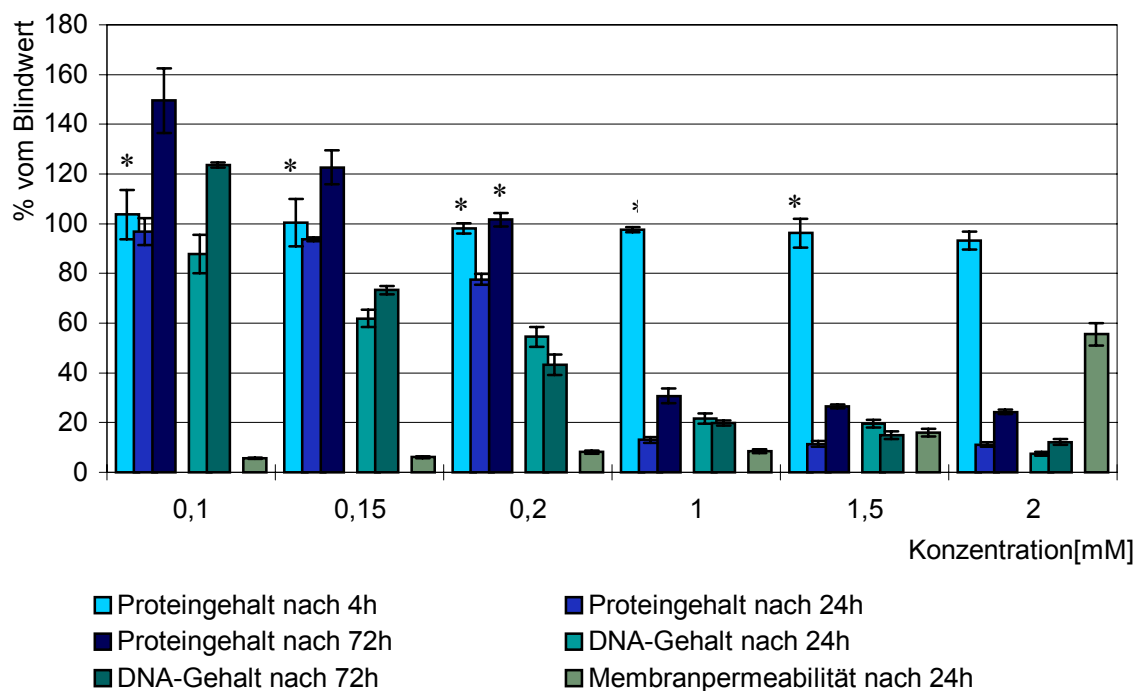


Abbildung 4-4: Einfluß von AR 12463 auf den Protein- und DNA-Gehalt sowie auf die Membranpermeabilität von Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha<0,05$, * kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

Die daraus resultierenden IC₅₀-Werte, kalkuliert über Kurvenanpassung, sind in Tabelle 4-2 zusammengetragen.

Inkubationszeit [h]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über Proteingehalt [mM]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über DNA-Gehalt [mM]
24	0,31	0,31
72	0,46	0,18

Tabelle 4-2: IC₅₀-Werte von AR 12463

Eine Inkubation von 4h mit AR 12463 hatte kaum einen Einfluß auf die Hep G2-Kultur (siehe Abbildung 4-4). Trotz fehlender Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte zum entsprechenden Blindwert war ein deutlicher Trend zur Abnahme des Proteingehalts der Kulturen bei steigender Konzentration zu erkennen.

Nach 72h trat eine Proliferationserhöhung bei einer Konzentration von 0,1mM auf, die von einer Steigerung des Proteingehalts der Kultur begleitet wurde. Die erhöhten Proteinwerte bei gleichzeitig sinkendem DNA-Gehalt setzten sich weiter fort. Erst bei einer Konzentration von 1mM korrelierten DNA- und Proteingehalt wieder.

Proliferierende Effekte konnten nach einer Inkubationszeit von 24h nicht beobachtet werden, wohl aber eine Erhöhung des Proteingehalts. Trotz hohen Proteingehalts war ein Absterben von Zellen schon bei 0,15mM zu erkennen. Bei AR 12463 schien es nicht zu einer Bildung von Metaboliten zu kommen, die toxischer sind, da der DNA-Gehalt nach 72h, vor allem bei den niedrigeren Konzentrationen höher war als nach 24h. Die Diskrepanz zwischen DNA- und Proteingehalt von mit AR 12463 behandelten Hep G2-Kulturen spiegelt sich deutlich in den IC₅₀-Werte für 72h wieder (siehe Tabelle 4-2).

AR 12463 zeigte einen ausgeprägten Einfluß auf die Membranpermeabilität, der sich mit steigender Konzentration ebenfalls erhöhte. Bei 2mM war dieser schon mit einer Erhöhung der Membranpermeabilität um über 50% beträchtlich, dürfte aber bei geringeren Konzentrationen nicht ausschließlich für die Toxizität verantwortlich sein.

4.1.2.3 FLM 5011

In Abbildung 4-5 sind die Ergebnisse der Proliferations- und Toxizitätsuntersuchungen von FLM 5011 an Hep G2-Kulturen dargestellt. Die daraus über Kurvenanpassung kalkultierten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 4-3 zusammengetragen.

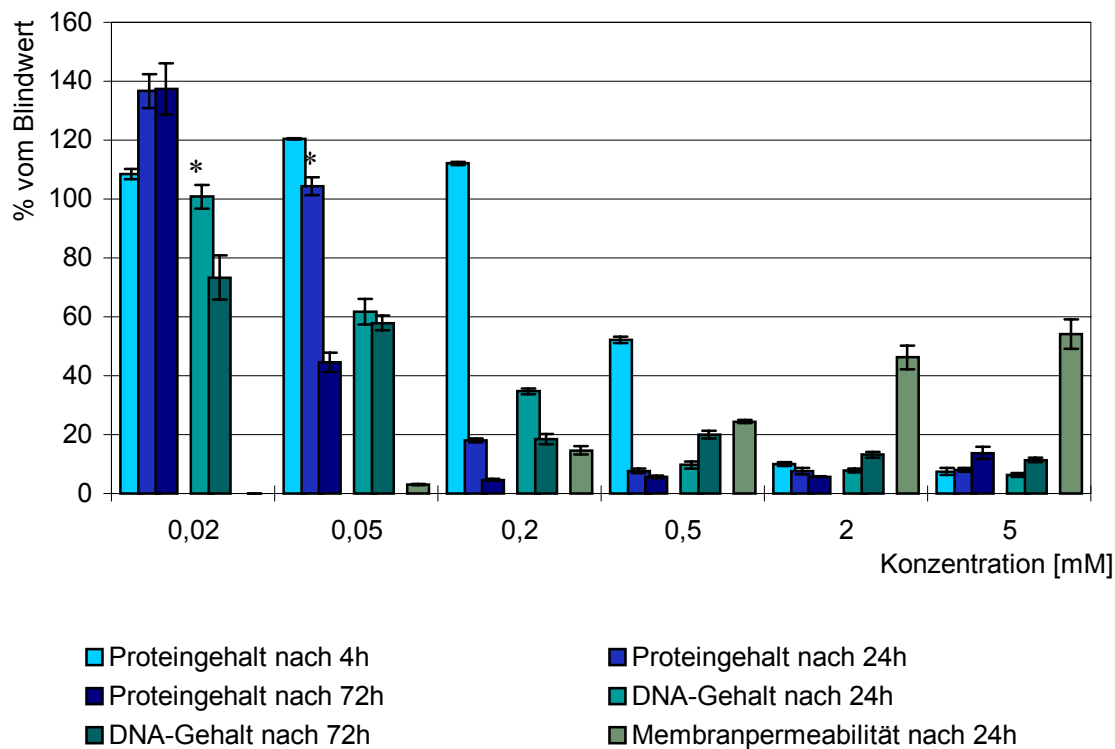


Abbildung 4-5: Einfluß von FLM 5011 auf den Protein- und DNA-Gehalt sowie auf die Membranpermeabilität von Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,05$, *kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

Inkubationszeit [h]	IC_{50} -Werte ermittelt über Proteingehalt [mM]	IC_{50} -Werte ermittelt über DNA-Gehalt [mM]
24	0,12	0,1
72	0,045	0,06

Tabelle 4-3: IC_{50} -Werte von FLM 5011

Bei niedrigen Konzentrationen zeigte FLM 5011 trotz bereits stark proliferationshemmender Effekte eine übermäßige Erhöhung des Proteingehalts in Hep G2-Kulturen. Mit steigender Konzentration kam es dann schnell zu einem ausgeprägten Absterben der Zellen, gekennzeichnet durch einen sehr geringen DNA- und Proteingehalt sowie einer starken

Erhöhung der Membranpermeabilität bei hohen Konzentrationen. Auch schon nach 4h kam es ab 0,5mM zu einem schnellen Absterben der Zellen. Da unter dem Mikroskop starke Veränderungen der Zellmorphologie, wie z.B. Bildung von „blebs“, zu erkennen waren, wurde eine weitere Untersuchung auf apoptotische Vorgänge angeschlossen (siehe 4.2).

Im Tierversuch konnten keine toxischen Erscheinungen von FLM 5011 beobachtet werden. Auch extrem hohe Konzentrationen führten nicht zum Tod von Versuchstieren [90]. Es konnte weiterhin festgestellt werden, daß die Metaboliten von FLM 5011 wesentlich weniger toxisch sind als die Ausgangssubstanz. In vivo unterliegt FLM 5011 einer ausgeprägten Verstoffwech-selung und wird dabei fast vollständig metabolisiert. In der Hep G2-Kultur aber wurde nur ein geringer Teil FLM 5011 umgesetzt und damit in weniger toxische Metaboliten umgewandelt (siehe 3.3.2). Dies erklärt die Diskrepanz zwischen der Toxizität in vivo und in vitro.

Die Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von Hep G2-Zellen durch FLM 5011 hängt offensichtlich mit seinem Wirkmechanismus als Lipoxxygenasehemmer zusammen. In diesem Zusammenhang kann vermutet werden, daß das Konzentrationsverhältnis von Arachidonsäure und deren durch die Lipoxxygenase gebildeten Metaboliten für das Wachstum und die Vitalität von Hep G2-Zellen von Bedeutung ist. Vor allem die Konzentration von 5(S)-HETE hat eine wichtige Funktion bei der Proliferation, denn es konnte gezeigt werden, daß 5(S)-HETE zur Steigerung der Proliferation führt und bei mit Lipoxxygenaseinhibitoren behandelten Zellkulturen das Absterben der Zellen verhindern kann [4]. Dieses Phänomen konnte auch an Hep G2-Zellen beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 72h zeigten mit 5(S)-HETE behandelte Hep G2-Kulturen eine wesentlich höhere Zellzahl als unbehandelte Kulturen. Dieser Effekt war bei einer 5(S)-HETE Konzentration von 1µM am größten. In Tabelle 4-4 sind die Ergebnisse der Bestimmung des DNA-Gehalts von mit 5(S)-HETE behandelten Kulturen mittels bisBenzimid dargestellt.

5(S)-HETE- Konzentration [µM]	DNA-Gehalt [%]
0	100 ± 8,6
0,1	102,5 ± 4,7
1	169,1 ± 17
10	120,1 ± 14,4

Tabelle 4-4: Einfluß von 5(S)-HETE auf die Proliferation von Hep G2-Zellen

4.1.2.4 *Solanum lycopersicon*

Die Tomate, *Solanum lycopersicon* L. oder auch *Lycopersicon esculentum* Mill., enthält wie andere Arten aus der Gattung *Solanum* viele Steroidalkaloide. Das Hauptglykosid der oberirdischen Organe ist das α -Tomatin, ein Tetraosid des Tomatidins. Der höchste Alkaloidgehalt wird in der Hauptblütezeit erreicht und beträgt dann 0,2-1,2%. Danach nimmt der Tomatingehalt ab und in reifen Früchten kann kein Tomatin mehr nachgewiesen werden. Des weiteren kommen noch andere Steroidalkaloide in der Tomate vor: das Glykosid des Solanidins, das α -Solanin und Solasodin.

Die meisten pharmakologischen Wirkungen der Steroidalkaloide lassen sich durch ihre saponinähnlichen Eigenschaften erklären. Durch Komplexbildung mit Sterolen schädigen sie die Erythrozytenmembran und haben damit eine hämolytische Aktivität. Sie reizen stark Haut und Schleimhaut und haben eine bakteriostatische, antivirale, fungizide und insektizide Wirkung. Am Herzen haben sie eine positiv inotrope Wirkung und sehr hohe Dosen sind teratogen. Auch eine Hemmung der Cholinesterasen wird diskutiert [106]. Bei peroraler Gabe werden die Solanum-Steroidalkaloide teilweise hydrolysiert und nur schlecht resorbiert, wobei die begleitenden Steroidsaponine die Resorption fördern. Die maximale Gewebskonzentration wird nach ca. 12h erreicht, wobei eine Akkumulation in Leber, Niere, Lunge und Milz möglich ist. Die Elimination erfolgt über Darm und Niere. Die Hauptmetaboliten sind die Aglykone, die auch Alkamine genannt werden [106]. Auch bei Hep G2-Kulturen konnte ein Umsatz von Tomatin zu Tomatidin festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei der Zufuhr von toxischen Dosen kommt es zu einer starken gastrointestinalen Reizung. Weitere Vergiftungserscheinungen sind Schwindel, Benommenheit, Kopfschmerzen, Temperaturanstieg und Bradykardie bis hin zu Krämpfen und Atemlähmung. Die toxischen Dosen beim Menschen werden bei peroraler Applikation auf 2-5 $\mu\text{mol/kg}$, die letale auf 3-6 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht geschätzt [106].

Mazerate von *Solanum lycopersicon* werden im Rahmen einer anthroposophischen Therapie zusammen mit Mistelpräparaten bei Hepatitis C eingesetzt [71, 72].

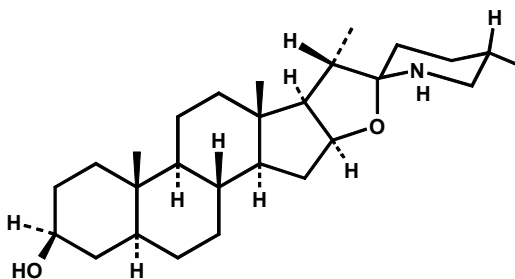
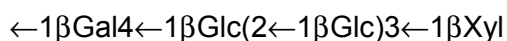


Abbildung 4-6: Strukturformel von Tomatidin. Der Zuckeranteil von Tomatin ist:



In Abbildung 4-7 sind die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen an Hep G2-Zellen mit

einem Mazerat des Krautes von *Solanum lycopersicon* dargestellt. Die Konzentration des Tomatins in diesem Mazerat war bekannt, weshalb hier die Tomatinkonzentrationen angegeben wurden, um mit der Reinsubstanz vergleichen zu können. Tomatin ist zwar das Hauptalkaloid, doch können auch andere Steroidalkaloide Einfluß auf die Proliferation haben. Diese kommen in wesentlich geringeren Mengen vor, sind aber ähnlich toxisch. Leider sind die genauen Konzentrationen im Mazerat nicht bekannt.

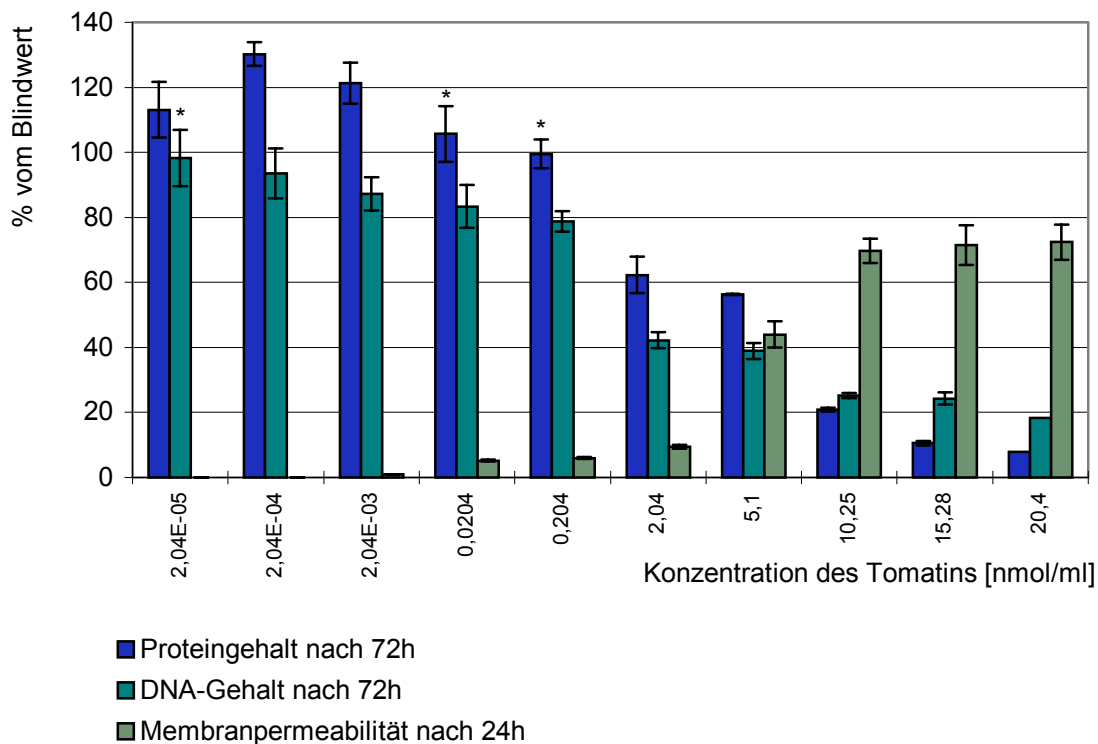


Abbildung 4-7: Einfluß eines *Solanum lycopersicon*-Mazerates auf Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,05$, * kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

Das *Solanum lycopersicon*-Mazerat zeigte eine ausgeprägte Membrantoxizität nach 24h. Dies dürfte der Grund für die starken zytotoxischen Erscheinungen bei höheren Konzentrationen im nmolaren Bereich bezogen auf den Tomatingehalt sein. In sehr niedrigen Konzentrationen entsprechend 0,02pmol-0,2nmol Tomatin war das Mazerat leicht proliferationshemmend, doch fand immer noch Zellteilung statt. Der Proteingehalt der Kulturen wurde erhöht. Diese Steigerung der Proteinsynthese hatte bei 0,2pmol Tomatin ein Maximum erreicht. Diese Ergebnisse wurden nun verglichen mit Proliferations-untersuchungen mit reinem Tomatin (siehe Abbildung 4-8). Auch Tomatin zeigt im nmolaren Bereich eine ausgeprägte Membrantoxizität. Da diese ähnlich hoch war wie beim *Solanum lycopersicon*-Mazerat, ist es möglich, daß die Membrantoxizität hauptsächlich durch Tomatin ausgelöst wurde.

Die Beeinflussung des Proteingehalts der Kulturen im pmolaren Bereich konnte nicht bestätigt werden, weshalb die Steigerung des Proteingehalts durch andere Substanzen hervorgerufen worden sein muß.

Sowohl bei Tomatin als auch beim Mazerat lag der Bruch zwischen Proliferationshemmung und Zelltod bei 2,04nmol/ml. Hierbei kam es bei Tomatin zu einer Diskrepanz zwischen DNA-Gehalt und Proteingehalt der Kulturen. Möglicherweise kommt es zu einer Hypertrophie der Zellen oder aber es bleiben viele Zellproteine auch schon toter Zellen am Substrat haften und wurden mitbestimmt. Unter dem Mikroskop konnte ein Schrumpfen der Zellen ohne Ablösung vom Substrat beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis auf apoptotische Vorgänge sein.

Da Tomatin auch in der Hep G2-Kultur zu Tomatidin umgesetzt wurde, wurde auch dieses auf seinen Einfluß auf Zellkulturen überprüft (siehe Abbildung 4-9). Dazu wurde Tomatidin in den gleichen Konzentrationen wie Tomatin eingesetzt. Doch erfolgte die Spaltung von Tomatin zu Tomatidin nicht quantitativ, denn nach 72h war Tomatin mittels DC noch nachweisbar.

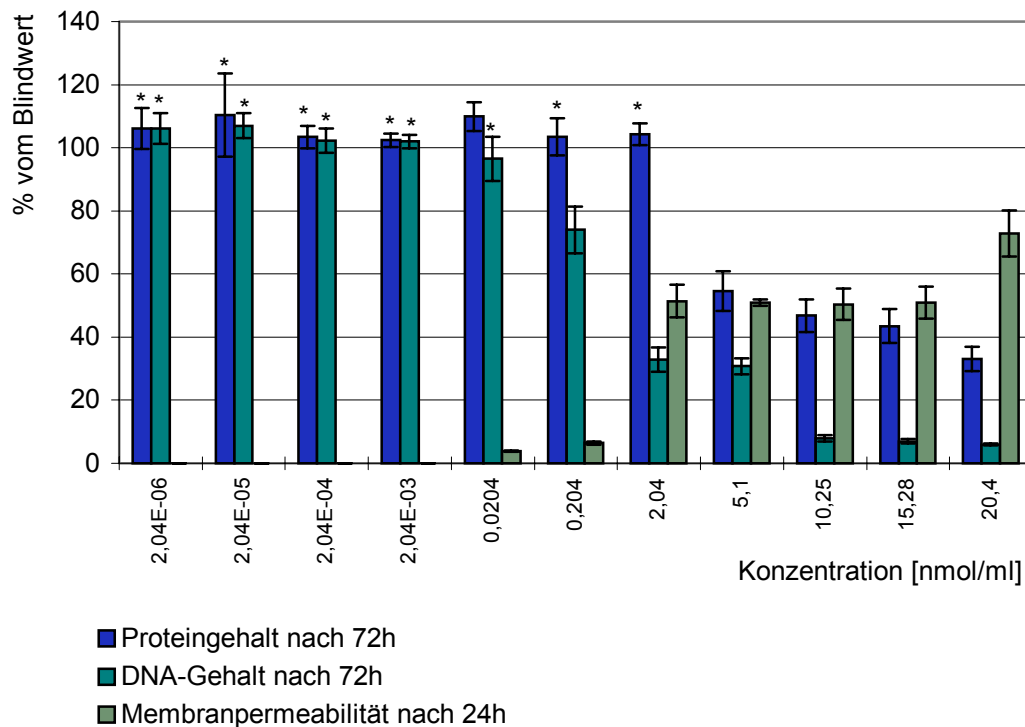


Abbildung 4-8: Einfluß von Tomatin auf Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,05$, * kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

Tomatidin hatte auf Hep G2-Zellen so gut wie keinen membrantoxischen Effekt (siehe Abbildung 4-9). In den niedrigen Konzentrationen zeigte es keine Hemmung der Proliferation, doch war der Proteingehalt der Kulturen gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Steigerung der Proteinsynthese

nach geringen Mengen des *Solanum lycopersicon*-Mazerats könnte also auf die Bildung von Tomatidin zurückgeführt werden.

Im nmolaren Bereich konnte dann eine Proliferationshemmung beobachtet werden, wobei mit steigender Konzentration auch ein Absterben von Zellen zu verzeichnen war. Im nmolaren Bereich ist nochmals eine starke Erhöhung des Proteingehalts gegenüber des DNA-Gehalts zu erkennen.

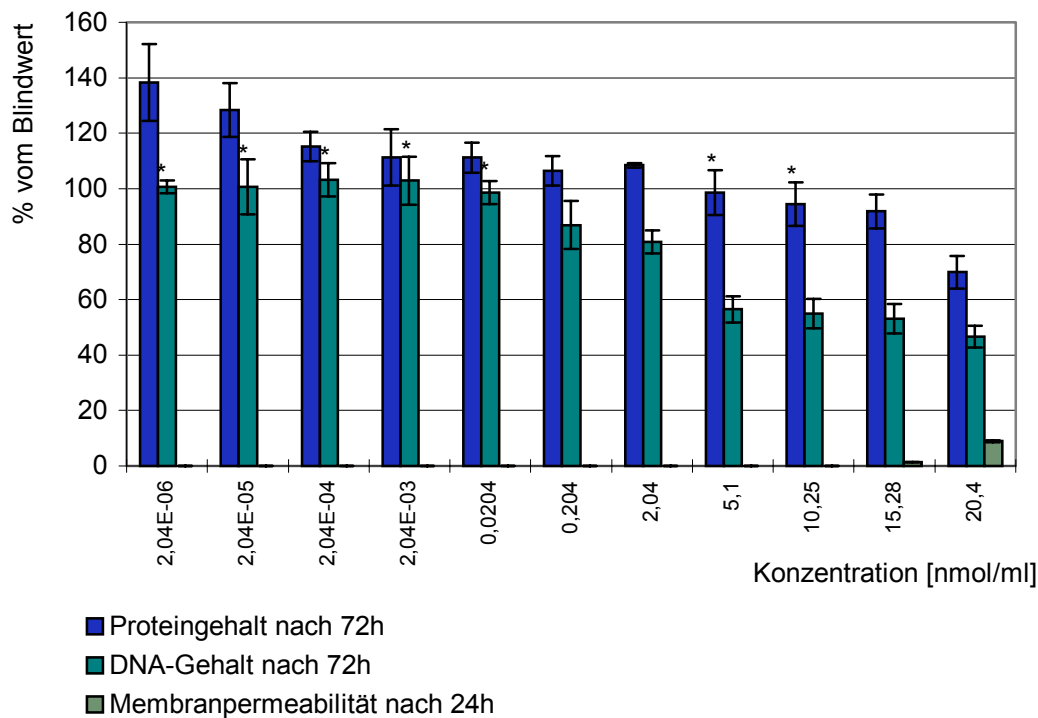


Abbildung 4-9: Einfluß von Tomatidin auf Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,05$,

* kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

Der Einfluß des Mazerats von *Solanum lycopersicon* auf Hep G2-Kulturen wurde größtenteils von den Hauptalkaloiden Tomatin und dessen Aglykon Tomatidin bestimmt. Die Erhöhung der Membranpermeabilität wurde wahrscheinlich überwiegend von Tomatin ausgelöst. Andere Steroidalkaloide, wie Solanin, Solanidin und Solasodin sind genauso wie das Aglykon Tomatidin weniger membrantoxisch. Die Erhöhung des Proteingehalts bei gleichbleibendem DNA-Gehalt könnte durch Tomatidineinfluß entstanden sein, welches während der Inkubationszeit aus Tomatin gebildet wird. Doch auch α -Solanin hatte in geringen Konzentrationen einen starken Einfluß auf die Proteinsynthese. So führten Konzentrationen von 0,58-1,2nmol/ml Solanin zu einer Erhöhung des Proteingehalts der Zellkulturen auf 175-181% bei gleichbleibendem DNA-Gehalt. Insgesamt war das *Solanum lycopersicon*-Mazerat im Bereich höherer Tomatin-konzentrationen etwas weniger toxisch als reines Tomatin, welches auf protektive Wirkungen

anderer Inhaltsstoffe hinweist.

In Tabelle 4-5 sind die IC₅₀-Werte des Mazerats von *Solanum lycopersicon*, Tomatin und Tomatidin noch einmal vergleichend zusammengestellt. Die IC₅₀-Werte des *Solanum lycopersicon*-Mazerats beziehen sich auf den Tomatingehalt, der in dem entsprechend zugesetzten Volumen des Mazerats enthalten war.

Zusatz	IC ₅₀ -Werte ermittelt über Proteingehalt [nmol/ml]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über DNA-Gehalt [nmol/ml]
<i>Solanum lycopersicon</i> - Mazerat	4,49	1,7
Tomatin	5,7	0,8
Tomatidin	-	15

Tabelle 4-5: IC₅₀-Werte des Mazerats des Krautes von *Solanum lycopersicon*, Tomatin und Tomatidin

4.1.2.5 3-Methylcholanthren

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie 3-Methylcholanthren (3-MC), induzieren vor allem CYP Isoenzyme der Familie I. Die Enzyminduktion geht ohne Hypertrophie des endoplasmatischen Retikulums von statten. 3-MC, möglicherweise auch ein Metabolit, bindet in der Zelle an einen zytosolischen Rezeptor. Dieser wiederum wird in den Zellkern geschleust und führt dort zu einer Derepression der CYP I-Gene und damit zu einer verstärkten Bildung der entsprechenden mRNA. Daran schließt sich eine erhöhte Synthese der Enzyme an [78, 79].

In der Hep G2-Kultur zeigte 3-MC schon nach 24h eine stark proliferationshemmende Wirkung (siehe Abbildung 4-10). Ab einer Konzentration von 1µM war ein Absterben der Zellen zu erkennen. Der Proteingehalt war nur wenig vermindert, was auf eine Erhöhung der Proteinsynthese zurückzuführen sein könnte.

Nach 72h wiederum war der Proteingehalt vermindert, während sich der DNA-Gehalt gegenüber einer Inkubationszeit von 24h kaum verändert hatte. Unter dem Mikroskop konnte nun eine starke Veränderung der Kultur beobachtet werden. Die Zellen waren zusammengeschrumpft und hatten nur noch geringen Kontakt mit dem Substrat.

3-MC führte nicht zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität, weshalb die hohe Toxizität nicht darauf beruhen kann.

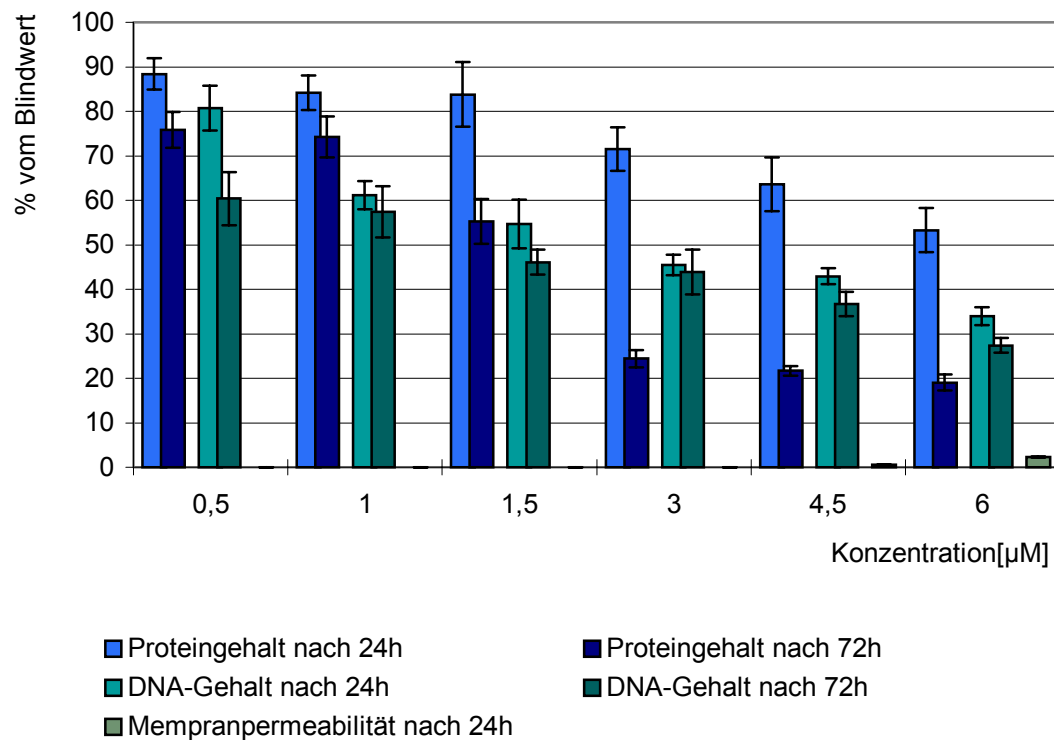


Abbildung 4-10: Einfluß von 3-Methylcholanthren auf den Protein- und DNA-Gehalt sowie auf die Membranpermeabilität von Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,01$

Die Diskrepanz zwischen Protein- und DNA-Gehalt der mit 3-MC behandelten Hep G2-Kulturen spiegelt sich auch in den kalkulierten IC_{50} -Werten wieder:

Inkubationszeit [h]	IC_{50} -Werte ermittelt über den Proteingehalt [µM]	IC_{50} -Werte ermittelt über den DNA-Gehalt [µM]
24	6	2,2
72	1,7	1,33

Tabelle 4-6: IC_{50} -Werte von 3-Methylcholanthren

4.1.2.6 Phenobarbital

Phenobarbital (Phenylethylbarbitursäure) ist das einzige als Antiepileptikum in Deutschland eingesetzte Barbitursäurederivat. Es ist wirksam gegen Grand mal Anfälle und fokale kortikale Anfälle. Phenobarbital (PB) induziert sowohl in vitro als auch in vivo das mikrosomale Monooxygenase-System, wobei die CYP-Isoenzyme unterschiedlich stark in ihrer Aktivität erhöht werden. Daneben werden einige Glucuronyltransferasen und andere Enzyme durch PB induziert, weshalb es in vivo zu einem stärkeren Metabolismus und einer schnelleren Elimination auch anderer Arzneistoffe kommen kann, die durch diese Enzyme abgebaut werden.

Die Induktion durch Barbiturate ist wahrscheinlich auf eine Erhöhung der Transkriptions- und Translationsrate, sowie einer Stabilisierung der mRNA zurückzuführen. Bei Induktion durch PB kommt es auch zu einer Veränderung in der Zelle: die Zelle hypertrophiert, das endoplasmatische Retikulum proliferiert und die Proteinsynthese ist stark erhöht. In vivo zeigt sich dies durch eine Vergrößerung der Leber [78].

Abbildung 4-11 zeigt die Ergebnisse der Proliferations- und Toxizitätsuntersuchungen von PB an Hep G2-Zellen.

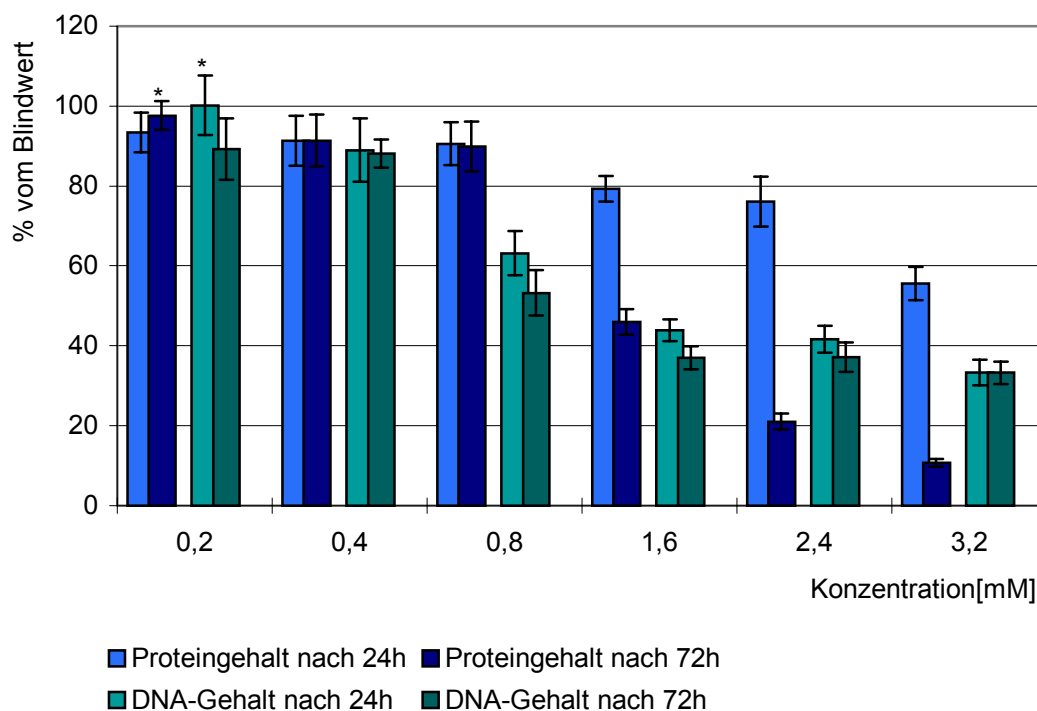


Abbildung 4-11: Einfluß von Phenobarbital auf den Protein- und DNA-Gehalt sowie auf die Membranpermeabilität von Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,05$, * kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

In Hep G2-Kulturen (siehe Abbildung 4-11) zeigte PB in geringen Konzentrationen einen leicht

proliferationshemmenden Effekt. Bei der für die Induktion eingesetzte Konzentration von 0,8µM hat überhaupt kein Wachstum stattgefunden. Doch ist der Proteingehalt hier im Vergleich zum DNA-Gehalt stark erhöht, was durch eine bei dieser und bei höheren Konzentrationen einsetzende Hypertrophie der Zelle mit verstärkter Proteinsynthese begründet sein könnte. Dies kann auch an Hand der IC₅₀-Werten erkannt werden.

Inkubationszeit [h]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über Proteingehalt [mM]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über DNA-Gehalt [mM]
24	3,4	1,3
72	1,55	0,83

Tabelle 4-7: IC₅₀-Werte von Phenobarbital

Veränderungen der Membranpermeabilität konnten nicht festgestellt werden, so daß die Zellzahlminderung nicht auf ein Absterben der Zellen durch erhöhte Membranpermeabilität zurückgeführt werden kann.

4.1.2.7 Clofibrat

Clofibrat (2-(4-Chlorphenoxy)-2-methylpropionsäureethylester) ist ein antilipidämischer Arzneistoff. Wie auch andere Clofibrinsäurederivate und auch Clofibrinsäure selbst, vermindert Clofibrat in vivo die VLDL-Konzentration im Plasma und hemmt die Cholesterolsynthese in der Leber. Im Plasma wird vor allem aber die Triglyceridkonzentration vermindert, während die Cholesterolkonzentration nur geringfügig vermindert und gelegentlich sogar leicht erhöht wird [97].

Clofibrat führt zu einer Induktion von CYP 4 A. Parallel dazu kommt es zu einer Vermehrung der Peroxysomen und einer Erhöhung von peroxysomalen Lipid-metabolisierenden Enzymen.

Die Ergebnisse der Proliferations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen von Clofibrat an Hep G2-Zellen sind in Abbildung 4-12 dargestellt.

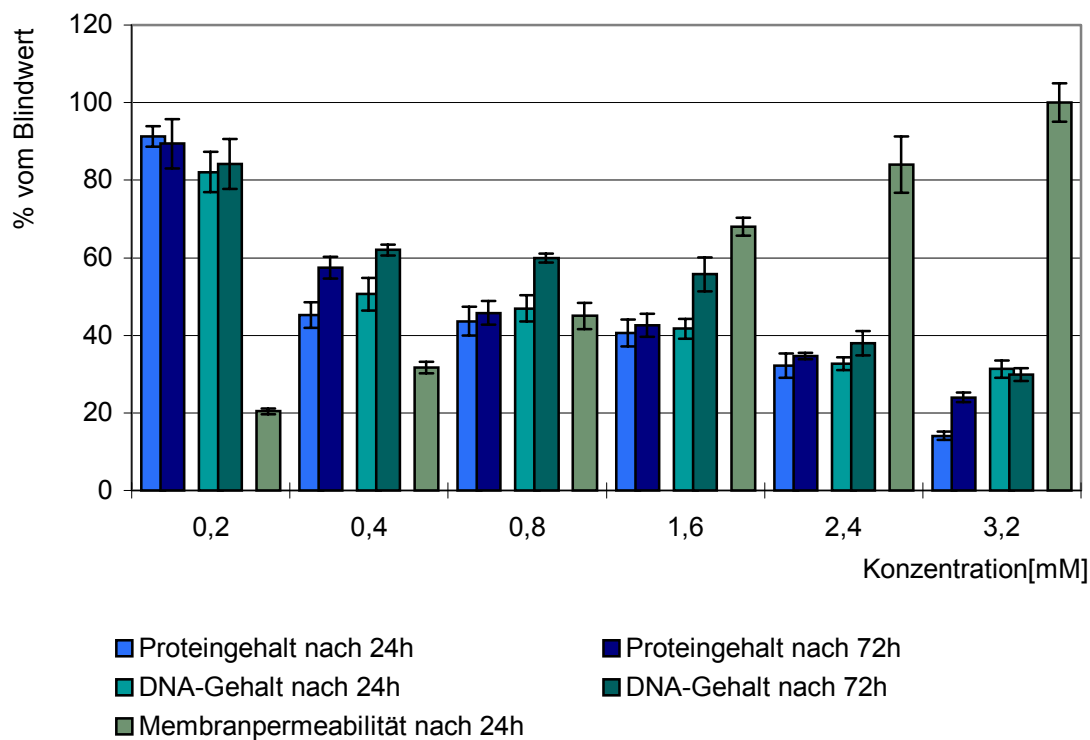


Abbildung 4-12: Einfluß von Clofibrat auf den Protein- und DNA-Gehalt sowie auf die Membranpermeabilität in Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,01$

In der Hep G2-Kultur kam es zu starken Störungen der Membranintegrität bei schon geringen Clofibratkonzentrationen. Bei 3,2µM Clofibrat war sogar die maximale Freisetzung an LDH aus dem Zytoplasma erreicht. Diese ausgeprägte Membrantoxizität dürfte der Auslöser für die stark proliferationshemmende Wirkung von Clofibrat bei niedrigen und für das Absterben von Zellen bei höheren Konzentrationen sein. Die durch Esterspaltung entstehende freie Clofibrinsäure könnte für diese Schädigungen verantwortlich sein.

Zu einer Steigerung der Proteinsynthese kommt es bei Clofibratzugabe nicht. Proteingehalt und DNA-Gehalt korrelieren miteinander, was auch die IC₅₀-Werte zeigen (siehe Tabelle 4-8)

Inkubationszeit [h]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über Proteingehalt [mM]	IC ₅₀ -Werte ermittelt über DNA-Gehalt [mM]
24	0,39	0,45
72	0,62	1,96

Tabelle 4-8: IC₅₀-Werte von Clofibrat

4.1.2.8 DMSO

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist eine farblose hygroskopische Flüssigkeit, die mit Wasser, Alkoholen, Aceton, Chloroform und Benzen mischbar ist. DMSO gehört zu den nukleophilen aprotischen Lösungsmitteln und löst deshalb vor allem Kationen sehr gut.

In der primären Hepatozytenkultur erhält DMSO die Albuminsynthese und verhindert die DNA-Synthese. Es hat differenzierende Eigenschaften und führt zu einer Stabilisierung von Morphologie und Überleben der Zellen. Dieser Effekt soll bei einer Konzentration von 0,5% einsetzen und bei 2% optimal sein. Ein Anstieg von Phenobarbital induzierbaren CYP-Isoenzymen durch DMSO konnte nicht beobachtet werden [7].

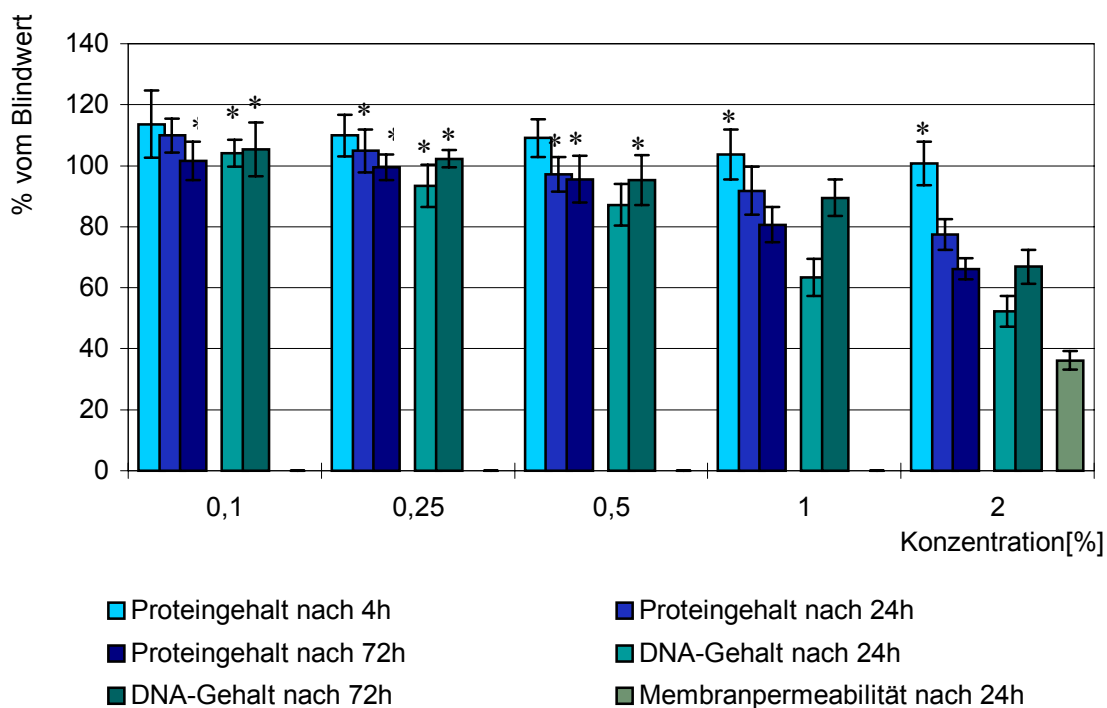


Abbildung 4-13: Einfluß von DMSO auf den Protein- und den DNA-Gehalt, sowie die Membranpermeabilität von Hep G2-Kulturen, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,05$, * kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

Auf Hep G2-Kulturen hatte DMSO einen proliferationshemmenden Effekt (siehe Abbildung 4-13). Der Einfluß auf den Proteingehalt war gering und nur bei höheren Konzentrationen war der Proteingehalt gegenüber dem DNA-Gehalt leicht erhöht. Vor allem nach 24h war die Zellzahl erniedrigt, weshalb es zu einem Absterben von Zellen gekommen sein mußte. Nach 72h hat sich die Zellzahl wieder erhöht. Es muß also zu einem Wachstum der überlebenden Zellen gekommen sein. Eine Membrantoxizität war nur bei 2% DMSO im Kulturmedium zu beobachten.

Diese lag bei 36,2%, weshalb eine Zugabe von 2% DMSO zum Kulturmedium, auch bei Hepatozytenkulturen nicht vorgenommen wurde. Eine Konzentration von bis zu 0,5% schien keine beträchtlichen Auswirkungen zu haben, weshalb bei allen Versuchen diese Konzentration nicht überschritten wurde. Trotzdem ist das Mitführen von Kontrollen bei Zytotoxizitäts- oder Proliferationsversuchen mit Substanzen, die in DMSO gelöst wurden vorteilhaft. Bei höheren DMSO Konzentrationen als 0,5% würde das Fehlen von Kontrollen zu verfälschten Ergebnissen führen.

4.1.2.9 Vergleich von DMSO mit anderen Lösungsmitteln

Die meisten Testsubstanzen, die im Rahmen von Biotransformations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen herangezogen wurden, waren nicht wasserlöslich.

Bei der Wahl des Lösungsmittels sollte nicht nur das Löseverhalten eine Rolle spielen, sondern auch der Einfluß des Lösungsmittels auf die Zellkultur. Aceton zeigte den geringsten Einfluß auf die Proliferation von Hep G2-Zellen. Die nur geringfügige Hemmung der Proliferation ist zwar günstig, doch verdunstet Aceton zu schnell, um genaue, kleine Volumina zu pipettieren. Eine längere Lagerung von Lösungen führt durch Verdunstung des Acetons zu zusätzlicher Ungenauigkeit.

Methanol hingegen zeigte nicht nur proliferationshemmende Eigenschaften, sondern auch ein geringes Absterben der Zellen bei einer Konzentration von 0,5%. Ethanol war zwar weniger toxisch und zeigte keinerlei Einfluß auf die Membranintegrität, war aber ebenfalls proliferationshemmend. Ethanol wird schnell metabolisiert und führt in Hepatozyten zu Veränderungen im Intermediärstoffwechsel [7]. Auch bei Methanol und Ethanol ist das genaue Pipettieren von kleinen Volumina aufgrund schneller Verdunstung problematisch [7].

DMSO mit nur geringen proliferationshemmenden Effekten und ohne auffälligen Einfluß auf den Proteingehalt (siehe 4.1.2.8), schien daher das geeignetste Lösungsmittel zu sein.

Lösungsmittel	Kontrolle	Aceton	Methanol	Ethanol	DMSO
DNA-Gehalt in %	100,0 ± 5	93,6 ± 5,4	71,6 ± 7	80,4 ± 8	87,2 ± 6,8

Tabelle 4.2-8: Einfluß von verschiedenen Lösungsmittel auf das Proliferationsverhalten von Hep G2-Kulturen über 24h bei einer Konzentration von jeweils 0,5%

4.1.2.10 7-Ethoxyresorufin

Im Rahmen der Überprüfung der optimalen Substratkonzentration von 7-Ethoxyresorufin (siehe 2.3.1.1) in Hep G2-Kulturen, wurden bei Konzentrationen über 8µM 7-Ethoxyresorufin Zellveränderungen beobachtet. Daher galt es, den Einfluß von 7-Ethoxyresorufin auf die Proliferation von Hep G2-Zellen zu untersuchen.

Die Proliferation von Hep G2-Zellen über 24h, die unterschiedlichen 7-Ethoxyresorufin-konzentrationen ausgesetzt waren, ist in Abbildung 4-14 dargestellt. Ermittelt wurde der DNA-Gehalt der Kulturen mittels bisBenzimid. In den Konzentrationen 1-2µM zeigte 7-Ethoxyresorufin keinerlei Auswirkung auf die Proliferation. Darüber hinaus, bis zu einer Konzentration von 16µM, inhibierte 7-Ethoxyresorufin das Wachstum der Zellen. 24µM 7-Ethoxyresorufin wirkten zytotoxisch auf Hep G2-Zellen und konnten damit für die Bestimmung von Enzymaktivitäten nicht eingesetzt werden.

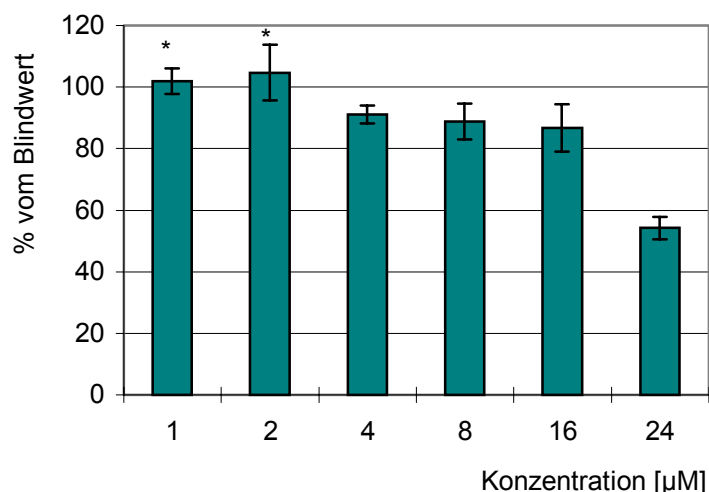


Abbildung 4-14: Einfluß von 7-Ethoxyresorufin auf die Proliferation von Hep G2-Kulturen innerhalb 24h, $\bar{x} \pm s$, $n=8$, $\alpha < 0,05$, * kein signifikanter Unterschied zum Blindwert

4.2 Apoptose

Der Zelltod tritt über zwei unterschiedliche Mechanismen auf: der Nekrose und der Apoptose.

Die Nekrose wird durch extreme Veränderung physiologischer Verhältnisse, z.B. pH-Änderungen oder hohe Temperaturen, hervorgerufen. Als Erstes verliert die Zelle dabei die Fähigkeit der Aufrechterhaltung der Homöostase, wodurch Wasser und extrazelluläre Ionen einströmen können und die Zelle, vor allem die Mitochondrien, anschwellen lassen. Schließlich kommt es zum Aufbrechen der Zellmembran und damit zur Lyse der Zelle. Da hierbei auch lysosomale Enzyme in den Extrazellularraum gelangen, ist in vivo ein nekrotischer Vorgang meist an eine Entzündung gekoppelt.

Im Gegensatz dazu tritt die Apoptose, der programmierte Zelltod, unter physiologischen Bedingungen auf. Es kommt zur Chromatinaggregation, zur Kondensation von Nukleus und Zytoplasma und schließlich zur Fragmentation der Zelle in kleine Partikel („apoptotic bodies“) mit intakter Membran, Zytoplasma, Kernmaterial, Ribosomen und intakten Mitochondrien. In vitro schwellen diese „apoptotic bodies“ an und lysieren. Dieser Vorgang wird sekundäre Nekrose genannt. In vivo werden die „apoptotic bodies“ schnell erkannt und durch Makrophagen oder durch angrenzende epitheliale Zellen phagozytiert.

Die Apoptose läuft innerhalb weniger Stunden ab. Dieser Zeitraum läßt sich in drei Stadien einteilen:

- ⇒ D1-Phase (*damage*, Aktivierungsphase): Hier wird die Expression diverser Gene aktiviert. Dazu gehört beispielsweise *c-myc*, *c-fos*, Gene von TGF β und Calmodulin. Die intrazelluläre Calcium-Konzentration steigt und das Chromatin aggregiert.
- ⇒ F-Phase (Fragmentation): Eine Calcium abhängige Endonuklease wird aktiviert und die DNA zwischen den Nukleosomen gespalten.
- ⇒ D2-Phase: Glutamin- und Lysinreste von Membranproteinen werden durch eine Transglutaminase vernetzt. Die Kernstruktur löst sich auf und die Zelle fragmentiert. In dieser Phase findet die Aussonderung der apoptotischen Zelle aus dem Zellverband statt [8].

Die wichtigsten Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose sind noch einmal in Tabelle 4-9 zusammengefaßt.

Nekrose	Apoptose
Morphologische Unterschiede	
Verlust der Membranintegrität	Membran-“blebbing“
Chromatinform bleibt erhalten	Chromatin aggregiert an der Kernmembran
Schwellen der Zelle	Zellschrumpfung
komplette Lyse der Zelle	Bildung von „apoptotic bodies“
Schwellung der Mitochondrien	alle Organellen bleiben intakt
biochemische Unterschiede	
Verlust der Regulation der Homöostase	enzymatisch regulierter Prozeß
passiver Prozeß	Energie- (ATP-) abhängiger Prozeß
zufällige Spaltung der DNA, keine Banden-	mono- und oligonukleosomale Fragmenta-
bildung im Elektropherogramm	tion der DNA, „Leiter“ im Elektropherogramm
DNA-Fragmentation nach Lyse der Zelle	DNA-Fragmentation vor der Lyse der Zelle
physiologische Unterschiede	
Tod von Zellgruppen	Tod einer einzigen Zelle im Verband
entsteht durch unphysiologische Verhältnisse	induziert durch physiologische Signale
Phagozytose durch Makrophagen	Phagozytose durch Makrophagen und angrenzende Zellen
Entstehen einer Entzündung	keine Entzündung

Tabelle 4-9: Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose [108]

Die Apoptose ist ein stark regulierter Prozeß, der über hormonelle und rezeptorvermittelte Signale kontrolliert wird. Eine große Rolle spielen Calcium-Ionen, die z.B. über den *second messenger* Inositol-(1,4,5)-triphosphat oder durch exogenen Substanzen aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden können. Viele Endonukleasen, Proteasen, Phosphatasen und Phospholipasen werden durch stark erhöhte zytoplasmatische Calcium-Konzentrationen aktiviert, wobei auch Calmodulin involviert ist.

Daneben sind andere signalübertragende Stoffe an der Auslösung von Apoptose beteiligt. Dazu gehören Proteinkinase C, cAMP, Protein Tyrosin Kinasen und Ceramide. Sie können aber auch die Apoptose hemmen. Proliferation, Differenzierung und Apoptose sind also nah verwandte Zellantworten, die viele molekulare Mechanismen gemeinsam haben [73]. Die vielfältigen Faktoren, die die Apoptose modulieren, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die eine Gruppe beeinflusst die Entscheidung der Zellen in der G₀-Phase, ist aber nicht an der Ausführung der Apoptose beteiligt. Dazu gehören die Onkogene, DNA-Schäden, Fas, der

Tumornekrosefaktor, das Tumorsuppressorgen p53 und die bcl-2-Familie. Faktoren, die direkt am Prozeß der Apoptose beteiligt sind, sind Proteasen der ICE (Interleukin-1 β -converting enzyme)-Familie, Nukleasen und Scramblase, die u.a. für die Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zytoplasmamembran während der Apoptose verantwortlich ist [31].

In vivo ist die Apoptose ein Beitrag zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, z.B. in Niere und Leber. Des weiteren kommt sie im Rahmen der Embryogenese bei der Entwicklung von Händen und Füßen, sowie bei der Gewebsatrophie, wie z.B. der Rückbildung des Milchdrüsen-gewebes nach der Laktation, vor. Sie soll auch der Aussonderung anormaler Zellen dienen, z.B. durch Auslösen von Apoptose in autoreaktiven Zellen über zytotoxische T-Zellen [8].

Interessant ist die Auslösung von Apoptose bei Zellen, die durch Überexpression von Wachstumsfaktoren einen gestörten Apoptoseablauf haben. Hier ergeben sich neue therapeutische Ansatzpunkte für die Bekämpfung von Krebs. Andererseits gibt es viele Krankheiten, die auf Grund exzessiver apoptotischer Vorgänge entstehen und die es zu bekämpfen gilt. Dazu gehören die HIV-Infektion und neurodegenerative Störungen, wie die Alzheimer Krankheit [69].

4.2.1 Erkennen von Apoptose

Ein typisches Kennzeichen für Apoptose ist die Fragmentierung der DNA durch endogene Nukleasen an den internukleosomalen Linker-Regionen in der F-Phase. Die Detektion von kurzen DNA-Bruchstücken kann daher zur Detektion von Apoptose dienen. Die zelluläre DNA wird nach Lyse der Zelle mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Durch Agarosegel-Elektrophorese und Anfärben mit Ethidiumbromid können dann die unterschiedlichen DNA-Banden im Elektropherogramm sichtbar gemacht werden („DNA-Leiter“). Auch der Nachweis der DNA-Bruchstücke über eine radioaktive Markierung ist möglich.

In einem früheren Stadium der Apoptose kommt es zu einer Veränderung in der Zellmembran. Während bei einer gesunden Zelle Phosphatidylserin nur auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite vorkommt, findet bei der apoptotischen Zelle eine Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran statt. Hier kann es durch Annexin V, einem Calcium-abhängigen, Phospholipid-bindendem Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin, detektiert werden. Da aber nekrotische Zellen nach Verlust der Membranintegrität Annexin V binden können, ist es notwendig mit einem Farbstoff, der nur in nekrotische Zellen mit permeabilisierter Membran eindringen kann, gegenzufärben. Dazu kann Trypanblau oder Propidiumiodid genutzt werden.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Apoptose ist die Bestimmung nuklearer proteolytischer Aktivität, denn das nukleare Enzym Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP), welches bei DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist, wird ebenfalls in einer frühen Phase durch Apoptose-

spezifische Proteasen gespalten. Diese Proteasen aus der ICE-Familie lösen die apoptotische Kaskade aus [28, 103]. Eine von ihnen ist z.B. die Protease Apopain, die PARP in zwei Fragmente schneidet. Die Spaltprodukte und PARP selbst können dann nach einer Gelelektrophorese mit polyklonalen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Andere ICE-verwandte Proteasen spalten auch Lamine. Lamine sind Filamentproteine, die für die Aufrechterhaltung der Struktur der inneren Zellmembran verantwortlich sind. Ihre Proteolyse führt zu der typischen morphologischen Transformation des Kerns. Diese Veränderungen können im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden [15].

4.2.2 Nachweis von apoptotischen Vorgängen nach Inkubation mit FLM 5011

Nach Inkubation von FLM 5011 auf Hep G2-Kulturen konnten bereits nach 24h starke morphologische Veränderungen an den Zellen erkannt werden. Die Zellen schrumpften und lösten sich vom Substrat ab. Eine starke „bleb“-Bildung der Zellen (siehe Abbildung 4-15), führten zu der Vermutung, daß für das gehäufte Auftreten von Zelltod nach Inkubation mit FLM 5011, apoptotische Vorgänge verantwortlich zu machen sind. Morphologische Veränderungen können frühestens nach 6-8h optisch beobachtet werden.

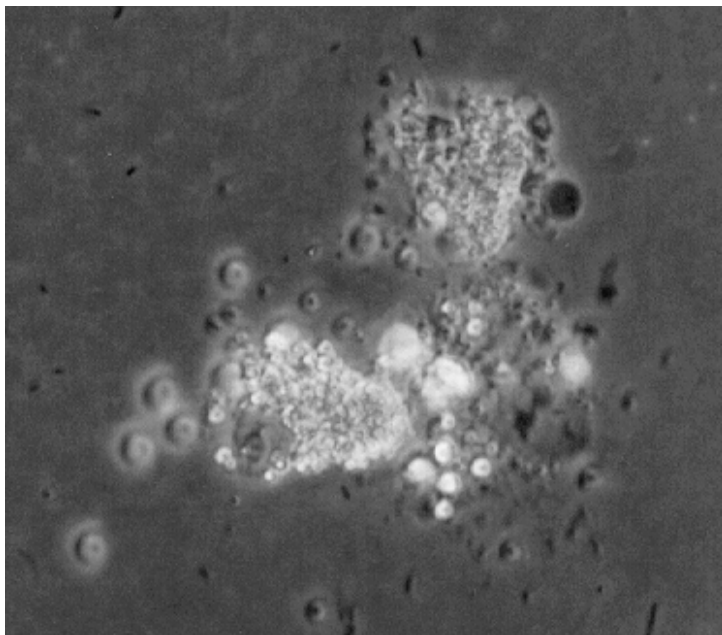


Abbildung 4-15: Zeiose: Bildung von "apoptotic bodies" bei Hep G2-Zellen nach Behandlung mit FLM 5011

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde DNA aus Hep G2-Kulturen extrahiert. Dazu wurden die Zellen mit dem Detergenz Triton X 100 lysiert. Anschließend folgte eine Chloroform-Phenol-

Extraktion der Zellsuspension mit dem Ziel, die wäßrige Phase von Proteinen zu befreien. Die Proteine werden dabei denaturiert und dissoziieren von der DNA. Auch Lipide werden dabei aus der wäßrigen Phase entfernt. Der Zusatz von Chloroform führt zu einem schnellen Trennen der Phasen, wobei die denaturierten Proteine als weiße Interphase zu erkennen sind. Zur Extraktion mit Phenol sollte farbloses Phenol verwendet werden, da rötlich verfärbtes Phenol Chinone enthält, die Phosphodiester spalten und die DNA quervernetzen können [110]. Nun wurde aus der wäßrigen Phase die DNA als Natriumsalz nach Zusatz von Natriumacetat mit Hilfe von Ethanol gefällt. Damit die Ausbeute an DNA groß genug war, mußte bei -20°C gefällt werden. Nach dem Waschen der DNA wurde sie in TE-Puffer zur Lagerung aufgenommen. EDTA chelatisiert dabei Schwermetallionen, die für DNase-Aktivität benötigt werden und der relativ hohe pH-Wert von 8 verhindert eine Deamidierung [110]. Um zu verhindern, daß die kurzkettigen Bruchstücke der RNA bei der Gelelektrophorese stören, wurden sie durch Behandlung mit RNase bei 37°C entfernt.

Nach Elektrophorese in einem Agarosegel konnten nun die DNA-Bruchstücke unterschiedlicher Länge mit Ethidiumbromid, welches zwischen den Basenpaaren interkaliert und fluoresziert, sichtbar gemacht werden.

In Abbildung 4-16 ist eine Photographie mit UV-Filter von einem Elektropherogramm abgebildet. DNA unbehandelter Zellen zeigten keine Fragmentierung. Die Kettenlänge der DNA lag über 5000 Basenpaare. Dies konnte abgeschätzt werden über die Marker Bromphenolblau bzw. Xylencyanol, welche bei diesen Bedingungen wie lineare doppelsträngige 300 Basenpaar- bzw., 4000 Basenpaar-DNA-Fragmente laufen, sowie über die DNA-Leiter. Nach 4h Inkubation mit FLM 5011 lag der Schwerpunkt der länger-kettigen DNA bei ca. 4000 Basenpaaren. Kürzere Fragmente konnten in geringen Konzentrationen im Bereich von 1000-2000 Basenpaaren beobachtet werden. Nach 24h wiederum waren im Bereich von 5000 Basenpaaren keine Fragmente mehr zu sehen, sondern nur noch im Bereich um 4000 Basenpaaren. Zwischen 100 und 2000 Basenpaaren konnten bandenförmig kurze Fragmente detektiert werden. Eine Fragmentation der DNA hat also nach Inkubation mit FLM 5011 bereits nach 4h in geringem Maß, da DNA-Fragmentierung frühestens nach 4h nachgewiesen werden kann, und nach 24h deutlich sichtbar stattgefunden.

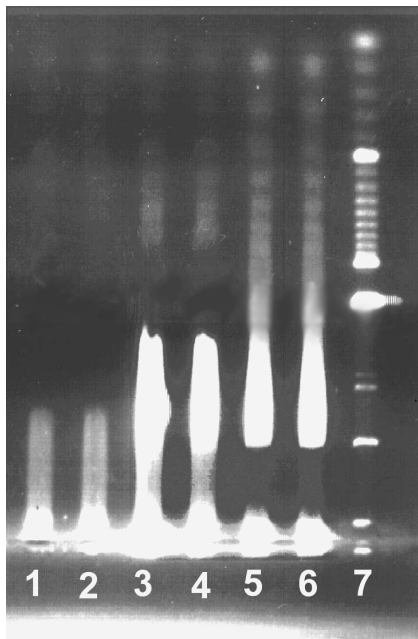


Abbildung 4-16: DNA-Gelelektrophorese

Reihe 1 und 2: DNA von unbehandelte Hep G2-Zellen

Reihe 3 und 4: DNA von 4h mit FLM 5011 behandelte Hep G2-Zellen

Reihe 5 und 6: DNA von 24h mit FLM 5011 behandelten Hep G2-Kulturen

Reihe 7: käuflich erworbene 100 Basenpaar-Leiter von GIBCO BRL als Kontrolle

Annexin V ist ein Calcium- und Phospholipid-bindendes Protein, welches antikoagulierend durch Inhibition der Prothrombinaktivierung wirkt. Es hemmt weiterhin Phospholipase A₂ und Proteinkinase C. Annexin V bindet sehr spezifisch an Phosphatidylserin, welches im frühen Stadium der Apoptose von der Innenseite der Plasmamembran nach außen geschleust wird. Dabei binden 4-8 Annexin-V-Moleküle an ein Phosphatidylserin, was das Signal für die Detektion intensiviert [109]. Die Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zytoplasmamembran kann frühestens nach 2-4h nachgewiesen werden.

Die Anfärbung der mit FLM 5011 behandelten Zellkulturen mit Annexin V fiel ebenfalls positiv aus.

Mit FLM 5011 vorbehandelte Hep G2-Zellen wurden mit einer Annexin-V-Biotin-Lösung inkubiert, dann fixiert, und schließlich nach diversen Waschschritten über eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht. Dazu wurde Streptavidin genutzt, welches spezifisch an Biotin bindet. Nach Zugabe von Diaminbenzidin wurde dieses durch die an Streptavidin gekoppelte Peroxidase zu einem rotbraun gefärbten Produkt umgesetzt. Apoptotische Zellen erschienen nun tief rotbraun, während alle anderen Zellen kaum gefärbt waren.

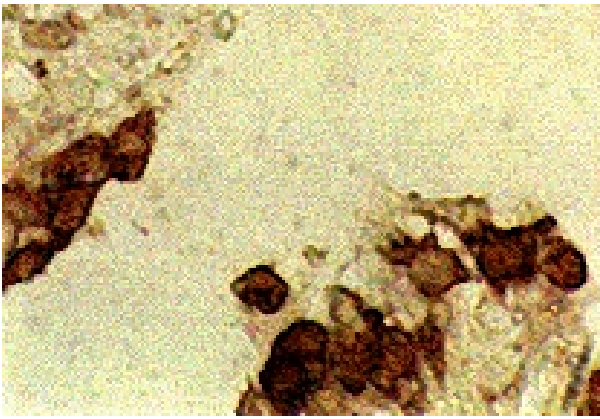


Abbildung 4-17: Färbung mit Annexin-V-Biotin

Nach einer 4-stündigen Inkubation mit FLM 5011 konnten nur wenig Zellen beobachtet werden, die mit Trypanblau angefärbt werden konnten und damit den nekrotischen Anteil der Zellen repräsentierten.

Die Färbung mit Annexin V hingegen zeigte eine große Zahl an gefärbten Zellen (siehe Abbildung 4-17), wodurch die Hypothese, daß es sich um apoptotische Vorgänge handelte, bestätigt wurde.

Das ApoAlert™ FLICE/Caspase-8 Fluorescent Assay Kit detektiert die Apoptose zu einem noch früheren Zeitpunkt, als es bei den anderen Methoden der Fall ist. Die Protease Caspase-8 (FLICE) gehört zu den ICE verwandten Proteasen und wird durch ein membrangebundenes Enzym aktiviert. FLICE steht ganz am Anfang der ICE-Proteasen Kaskade, bei der ICE-Proteasen entstehen, die für die Spaltung von DNA-reparierenden Enzymen wie PARP verantwortlich sind.

Die FLICE-Aktivität wurde hierbei durch Zugabe eines exogenen Substrats detektiert. Dabei handelte es sich um 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC), welches an ein Tetrapeptid gebunden war. Die Fluoreszenz von AFC wird, nach Abspaltung vom Tetrapeptid IETD durch FLICE, bathochrom verschoben. FLICE-Aktivitäten können schon nach 1-2h nachgewiesen werden [3]. In FLM 5011 behandelten Kulturen wurde die FLICE-Aktivität nach unterschiedlichen Zeiten bestimmt (siehe Abbildung 4-18).

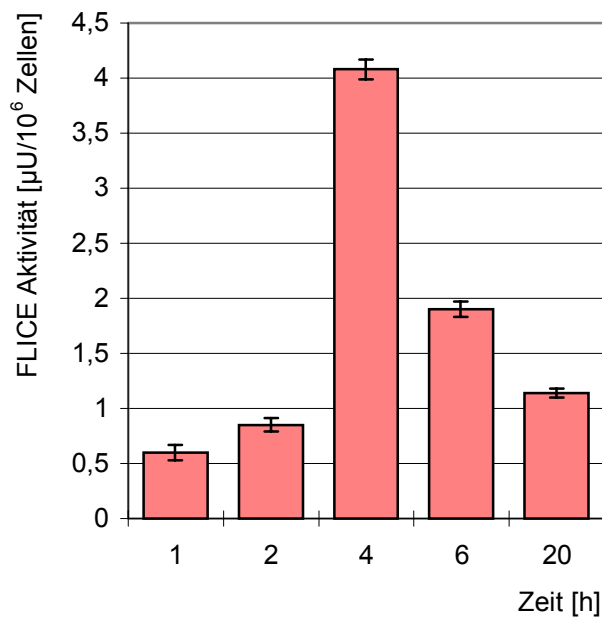


Abbildung 4-18: FLICE-Aktivität in FLM 5011 behandelten Hep G2-Kulturen

Nach 1-2h war zwar nur eine geringe, aber deutlich detektierbare FLICE-Aktivität zu beobachten. Die maximale FLICE-Aktivität wurde nach 4h erreicht. Danach nahm die FLICE-Aktivität in den Hep G2-Zellen wieder ab, was durch Abbau des Enzyms und durch Einsetzen der sekundären Nekrose erklärt werden könnte.

Apoptose ausgelöst durch 5-Lipoxygenaseinhibitoren konnte durch Zusatz von 5(S)-HETE in einigen transformierten Zellen verhindert bzw. reduziert werden [39], was annehmen läßt, daß die Reduktion der 5(S)-HETE-Konzentration, nicht aber der Anstieg von Arachidonsäure oder deren vermehrte Cyclooxygenase Metaboliten, der auslösende Faktor sei. Um diese These zu überprüfen, wurden Hep G2-Zellen mit FLM 5011 unter Zusatz unterschiedlicher 5(S)-HETE Konzentrationen inkubiert und anschließend die FLICE-Aktivität quantifiziert.

Zusatz	FLICE-Aktivität [µU/10 ⁶ Zellen]
FLM 5011	4,08 ± 0,09
FLM 5011 + 0,1µM 5(S)-HETE	2,79 ± 0,07
FLM 5011 + 1µM 5(S)-HETE	2,14 ± 0,05
FLM 5011 + 10µM 5(S)-HETE	0,26 ± 0,05

Tabelle 4-10: FLICE-Aktivitäten in Hep G2-Zellen nach 4h Inkubation mit 0,05mM FLM 5011 und unterschiedlichen 5(S)-HETE-Konzentrationen

Der Zusatz von 5(S)-HETE reduzierte deutlich die FLICE-Aktivität auf weniger als ein Zehntel der Aktivität ohne 5(S)-HETE Zusatz (siehe Tabelle 4-10). Dies bestätigt die Vermutung, daß die Verringerung der 5(S)-HETE-Konzentration in der Hep G2-Zelle ein Signal für Apoptose sein kann.

Auch schon in anderen transformierten Zellen konnte festgestellt werden, daß die Inhibition der Lipoxxygenase Apoptose auslöst [2, 4, 19, 39, 104]. Tang et al. [104] konnten zeigen, daß durch Inhibition der Lipoxxygenase die Konzentration von bcl-2, ein Protein, welches die Überlebenszeit von Zellen verlängert, reduziert wird, so daß es nach 48h nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Konzentration des bax-Proteins, welches bcl-2 komplexiert und damit antagonisiert, sank zwar auch, aber in wesentlich geringerem Maß, so daß insgesamt der bcl-2/bax-Quotient stark gesenkt wurde. Ein niedriger Quotient bedeutet, daß weniger bcl-2-bax-Heterodimere entstehen und mehr freie, Apoptose auslösende bax-Homodimere vorhanden sind [111]. Bax-Homodimere sind wiederum an der Aktivierung von Floppasen, wie z.B. Scramblase, beteiligt, welche für die Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zytoplasmamembran verantwortlich sind.

Die Ergebnisse lassen annehmen, daß die Lipoxxygenase eine wichtige Rolle bei der Modulierung von Proliferation und Zelltod spielt. Tang et al. [104] vermuten, daß das Lipoxxygenasesystem mit Hilfe von reaktiven freien Radikalen bestimmte Gene, wie die der ICE-Proteasen, reguliert. Letztere wiederum sind dann für die Steuerung der bcl-2 Expression und damit für die Regulation von Proliferation und Zelltod verantwortlich.

5 Diskussion und Zusammenfassung

Die Suche nach alternativen Methoden zu Tierversuchen ist weltweit ein aktueller Gegenstand in der Wirkstoffforschung. Die vorliegende Arbeit ordnet sich mit der Bearbeitung einiger Fragen des Fremdstoffmetabolismus in diese Richtung ein. Sie hatte die Aufgabe, die Eignung von Hep G2-Zellkulturen als in vitro-System zur Untersuchung der Biotransformation und Toxizität festzustellen und erhaltene Ergebnisse mit denen anderer in vitro-Testsysteme entsprechender Komplexität zu vergleichen. Hierzu wurden insbesondere primäre Zellkulturen von Rattenhepatozyten herangezogen, da diese häufig als in vitro-Modell genutzt werden und dementsprechend viele Vergleichsdaten vorliegen [z.B. 22, 82, 83, 98]. Zusätzlich erfolgten einige Untersuchungen an Lymphozytenkulturen, die aufgrund der enzymatischen Ausstattung als Komplementärsystem von Interesse sind.

Primärkulturen von Hepatozyten sind das am häufigsten eingesetzte in vitro-System für Studien zur Biotransformation, da die Leberparenchymzelle über das fast komplette für den Fremdstoffmetabolismus relevante Enzymmuster mit hoher Aktivität verfügt. Allerdings ist die Lebensdauer von Primärkulturen, insbesondere von kultivierten Hepatozyten, begrenzt. Diese hängt neben den objektiv bedingten Veränderungen der Zelle unter in vitro-Bedingungen von vielen experimentellen Faktoren ab.

Der entscheidende Schritt für die Kultivierung von Hepatozyten ist deren Isolation. Bei hoher Ausbeute sollten die isolierten Zellen eine ausreichende Vitalität besitzen. Die Zwei-Schritt-Methode nach Seglen et al. [93] mit Kollagenase, z.B. aus *Clostridium histolyticum*, führt zu einer Gewebedesintegration, ohne die isolierten Hepatozyten zu stark zu schädigen [57]. Mit dieser Methode konnte hier ein zufriedenstellendes Ergebnis mit einer Vitalität von 80% erreicht werden. Die Hepatozyten wurden als Monolayer kultiviert. Ein kritischer Schritt zu Beginn der Kultivierung nach Einsaat der Zellen ist die Anheftung der Hepatozyten an das Substrat, wofür hierbei Kollagen I benutzt wurde. Da sich nicht alle Zellen anheften, muß hier mit einem Verlust an Material gerechnet werden. Problematisch kann sich auch die Anheftung von stark geschädigten Zellen auf vitale Zellen auswirken. Die geschädigten Zellen können nicht mehr entfernt werden und es kommt zu verfälschten Werten bei der Zellzählung.

Die Isolierung und Kultivierung von Hepatozyten ist relativ kostenintensiv, bedingt durch einen hohen Tierverbrauch bei der Gewinnung der Zellen und durch den Einsatz teurer Chemikalien.

Lymphozytenkulturen sind ebenfalls Primärkulturen. Die Isolation der Zellen aus der Rattenmilz ist weniger problematisch. Bei Zellausbeuten von bis zu 10^7 Lymphozyten pro Milz und einer hohen Vitalität von über 90% konnte schnell und kostengünstig gearbeitet werden. Die Kultivierung als Suspension gestaltet sich relativ einfach, da der komplizierte Schritt der Anheftung entfällt. Nachteilig ist auch hier der hohe Verbrauch an Versuchstieren.

Biotransformationsuntersuchungen mit Primärkulturen sind auf Grund der begrenzten

Lebensdauer der Zellen nur eingeschränkt durchführbar. Entsprechende Zelllinien mit hoher Proliferationsrate sind dagegen für Monate bis Jahre weiter verwendbar. Die Isolations- und Reinigungsschritte entfallen, so daß dadurch bedingte schädigende Einflüsse auf die Zellen nicht vorhanden sind.

Die Hepatomzelllinie Hep G2 ist eine immortalisierte Leberzelllinie humanen Ursprungs mit epithelartiger Zellmorphologie. Im Gegensatz zu Hepatozyten ist sie in Kultur stark proliferierend und behält im Verlauf der Kultivierung viele spezifische Funktionen bei. Die Kultivierung erfolgte als Monolayer. In dieser Form ist das Wachstum der Zelle sehr stark. Aufgrund unzureichender Kontakthemmung können hierbei Zellhaufen entstehen, die eine genaue Zellzählung erschweren. Sie sind mit Trypsin nur schwer in Einzelzellen aufzuschließen. Man kann sie teilweise durch regelmäßiges Abzentrifugieren nach der Trypsinierung eliminieren. Ein Vorteil der geringen Kontakthemmung besteht in einer damit einhergehenden verringerten Dichtebegrenzung und damit einer hohen Sättigungsdichte. Hep G2-Zellen zeigten eine hohe Plattiereffizienz (ca. 90%, siehe Abbildung 2-3) und haben einen kleineren Serumbedarf als Hepatozyten. Allerdings führt ein geringerer Serumzusatz zu einem langsameren Wachstum sowie zur Beeinflussung biochemischer Leistungen [24].

Die Ermittlung der fremdstoffmetabolischen Aktivitäten der einzelnen Zellkulturen erfolgte über die quantitative Erfassung des Umsatzes von Modellsubstanzen. Zur Charakterisierung der Phase I-Biotransformation wurden dabei solche Substrate eingesetzt, die eine relativ hohe Spezifität für wenige Isoenzyme des Monooxygenasesystems Cytochrom P450 (CYP), der enzymatischen Hauptkomponente des Fremdstoffmetabolismus, aufweisen. Die ausgewählten Substanzen können leicht in die Zelle penetrieren und die dort gebildeten Metaboliten werden in das Kulturmedium abgegeben, ohne daß es zu einer Akkumulation im Zellrasen oder in der extrazellulären Matrix kommt [22, 57].

Neben der Bestimmung der CYP-Basisaktivität der Zellen wurden Untersuchungen zur Induzierbarkeit vorgenommen.

Die Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin und 7-Ethoxycoumarin wird durch die Isoenzyme CYP 1 A1 und 2 bzw. CYP 2 A1 und 2 katalysiert. Die Aktivitäten dieser Isoenzyme waren in Hep G2-Zellen höher als in Hepatozyten. Die geringere Umsatzrate in Hepatozyten kann jedoch durch Veränderungen in der Zusammensetzung des Kulturmediums erhöht werden und hängt darüber hinaus vom Rattenstamm ab. Die Induzierbarkeit der Isoenzyme CYP 1 A1 und 2, die beide 7-Ethoxyresorufin umsetzen, ist in Hep G2-Zellen und Rattenhepatozyten recht ähnlich. Beide Zellarten zeigten nach Inkubation mit 3-MC eine starke Erhöhung der Umsatzrate, während die Vorbehandlung mit PB nur einen geringen Anstieg der Enzymaktivität auslöste. Die schwache Induktion durch PB kann auf eine geringe Beteiligung des PB-induzierbaren CYP 2 B1 zurückzuführen sein, welches geringfügig an der Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin beteiligt

ist.

Im Gegensatz dazu ist die Induzierbarkeit der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase durch PB höher. Dies ist durch eine andere Spezifität der entsprechenden Reaktion bedingt, die durch die Isoenzyme CYP 2 A1 sowie 2 B1 und 2 katalysiert wird.

Hinsichtlich der subzellulären Verteilung in Hep G2-Zellen sind die Enzymaktivitäten fast ausschließlich in Mikrosomen zu finden.

Lymphozyten haben im Rahmen von Biotransformationsuntersuchungen als Testsystem für Monooxygenierungen Bedeutung erlangt, da sie lediglich CYP-Aktivitäten aufweisen. Damit ist es möglich, CYP-katalysierte Reaktionen isoliert zu betrachten und Aussagen zur Rang- und Reihenfolge von Reaktionsschritten bei der Fremdstoffmetabolisierung insbesondere bei komplexen Prozessen abzuleiten. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Untersuchungen vorgenommen, die bereits bekannte Erkenntnisse ergänzen sollten. Das Isoenzyme CYP 1 A1 kommt in Lymphozyten konstitutiv mit geringer Basisaktivität vor [35]. Erwartungsgemäß erhöhte der Induktor 3-MC die Aktivität, während PB eher hemmend wirkte. Auch eine Inkubation mit dem Mitogen Concanavalin A bewirkte eine Erhöhung des Umsatzes des Substrates 7-Ethoxyresorufin, woraus geschlußfolgert werden kann, daß die Monooxygenaseaktivitäten von Proliferationsprozessen der Zellen abhängig sind.

Neben den oben beschriebenen Isoenzymen ist die CYP 3-Familie für den Fremdstoffmetabolismus von Interesse. Aminophenazon diente dabei als Substrat zur Untersuchung von CYP 3 A1 und 2, die die Verbindung N-demethylieren. Hierbei zeigten die Hepatozyten eine höhere Enzymaktivität als Hep G2-Zellen. Nach Vorbehandlung mit dem spezifischen Induktor Dexamethason erhöhte sich leicht die Aktivität ohne jedoch die entsprechenden Werte der Hepatozyten zu erreichen. Die Verbindungen 3-MC und PB waren ebenfalls von nur geringem Einfluß.

In den Hep G2-Zellen wurde der Hauptanteil der Aminophenazon-N-demethylase-Aktivität in den Mikrosomen gefunden. Jedoch waren in anderen Zellorganellen, wie Mitochondrien, Lysosomen und Peroxysomen, noch beträchtliche Aktivitäten zu finden. Der detektierbare Umsatz von Aminophenazon im Zytosol dürfte aus Verunreinigungen der Präparation oder durch unspezifische Demethylasen zurückgehen.

Die Reduktion des Modellsubstrates 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen wird u.a. durch die Isoenzyme der Subfamilie CYP 4 A katalysiert. In Hep G2-Zellen konnte eine sehr viel höhere Aktivität nachgewiesen werden als in Hepatozyten. Durch Vorbehandlung mit dem spezifischen Induktor Clofibrat ließ sich diese Azoreduktase-Aktivität weiter steigern. Die Erklärung für den schwachen Umsatz in Hepatozyten könnte im anderen Weg der Metabolisierung des Substrats zu finden sein. So kann die Verbindung prinzipiell durch andere Isoenzyme demethyliert und ringhydroxyliert werden. Bei diesem Weg würde dann eine geringe Menge des Produkts 4-(N,N-Dimethylamino)anilin entstehen. Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor der CYP-Aktivität

Metyrapon führte zu einem drastischen Abfall des Umsatzes. Damit wird die Beteiligung der Monooxygenasen an der Azoreduktion unterstrichen. Man kann jedoch nicht ausschließen, daß ein Teil des Substrates durch Reduktasen metabolisiert wird. Das wird besonders deutlich, wenn man sich die subzelluläre Verteilung der Aktivitäten ansieht. Der Anteil der Mikrosomen dürfte auf CYP-Isoenzyme zurückgehen. Im Zytosol können es nur Reduktasen sein.

Lymphozyten der Wistar-Ratte zeigten einen wesentlich geringeren Umsatz an DAB als Hep G2-Kulturen und Hepatozyten der Ratte. Die Aktivität dürfte ebenfalls sowohl auf CYP-Aktivität, auf Grund der Induzierbarkeit durch Clofibrat, als auch auf zytosolische Reduktasen zurückzuführen sein. Weiterhin erhöhte Behandlung mit Concanavalin A die Azoreduktion.

Die Konjugation von p-Nitrophenol durch Glucuronyltransferasen und Sulfotransferasen ist eine repräsentative Reaktion des Phase II-Prozesses der Biotransformation. Hepatozyten und Hep G2-Zellen haben relativ hohe Enzymaktivitäten, die sich über einen längeren Kultivierungszeitraum nicht verändern. Interessant ist die Induzierbarkeit. Im Gegensatz zu Hepatozyten, deren Glucuronyltransferasen und Sulfotransferasen größtenteils durch 3-MC induziert werden, lassen sich in Hep G2-Zellen diese Aktivitäten mit PB in noch höherem Ausmaß stimulieren. Subzellulär sind diese Enzymaktivitäten vor allem in den Mikrosomen zu finden.

Die Charakterisierung der fremdstoffmetabolischen Aktivitäten in Hepatozyten und Hep G2-Zellen konnte durch die Bestimmung repräsentativer Enzyme der Biotransformation vorgenommen werden. Vergleicht man beide Zellarten unter Hinzuziehung von Ergebnissen aus der Literatur (siehe Tabelle 5-1), stellen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede heraus. Dabei muß man zwischen Basisaktivität, bedingt durch das Vorhandensein konstitutiver Enzyme, und der durch Induktion hervorgerufenen enzymatischen Aktivität differenzieren. Die in der Literatur häufig geäußerte Ansicht, Leberzelllinien haben grundsätzlich ein anderes Isoenzymmuster mit verschobener Aktivität, kann pauschal nicht bestätigt werden. Für eine Aussage sollten grundsätzlich die Einzelenzyme charakterisiert und verglichen werden, die die gleiche oder zumindest ähnliche Substratspezifität haben.

Neben den in Tabelle 5-1 aufgeführten Ergebnissen wurde festgestellt, daß sowohl Rattenhepatozyten als auch Hep G2-Zellen Benzyloxyresorufindealkylase- (CYP 2 B1 und 2, [41]), Glutathion-S-transferase- [24, 83], Epoxidhydrolase- [24, 41] und Arylhydrocarbonhydroxylase-Aktivität [87] besitzen, wobei die Aktivitäten nicht miteinander verglichen wurden. Im Gegensatz zu Hepatozyten der Ratte besitzen Hep G2-Zellen keine CYP 2 E1-Aktivität [87, 77], was über die Aktivitätsbestimmung der p-Nitrophenolhydroxylase und der Anilhydroxylase getestet wurde.

Enzym (Substrat)		Aktivität in Hep G2-Zellen	Aktivität in Hepatozyten der Ratte
CYP 1 A1/2 (7-Ethoxyresorufin)		+++	++
Induzierbarkeit	3-MC	+++	
	PB	+	
CYP 1 A1/2, CYP 2 B1/2 (7-Ethoxycoumarin)		+++	++
Induzierbarkeit	3-MC	+++	
	PB	++	
CYP 3 A1/2 (Aminophenazon)		+	++
Induzierbarkeit	3-MC	-	
	PB	(+)	
	Dexamethason	+	
CYP 4 A (DAB)		++	+
Induzierbarkeit	3-MC	-	
	PB	-	
	Clofibrat	++	
Glucuronyl-/ Sulfotransferase (p-Nitrophenol)		++	+++
Induzierbarkeit	3-MC	++	+++*
	PB	+++	+*

Tabelle 5-1: Fremdstoffmetabolische Enzymaktivitäten in Hep G2-Zellen und Rattenhepatozyten, + geringe, ++ mittlere, +++ hohe Aktivität bzw. Induzierbarkeit, *[58, 67]

Die unterschiedliche Wahl von Kulturmedien, Kulturformen und Isolationsmethoden erschwert den konkreten Vergleich der Ergebnisse, insbesondere auch mit Befunden aus der Literatur. Hier sind die methodischen Modifikationen sehr vielfältig. Es ist bekannt, daß Enzyme, wie z.B. CYP, durch Zusammensetzung des Nährmediums und durch Zusatz von Serum, Hormonen und Wachstumsfaktoren unterschiedlich beeinflusst werden können, so daß entsprechende Enzyme gehemmt, aber auch induziert werden können [23, 24, 25]. Die verschiedenen Zellarten werden auf diese Faktoren in unterschiedlichem Grad antworten.

Die Überprüfung der Enzymausstattung von Hep G2-Zellen ist nicht nur von akademischen Interesse. Im Rahmen der angewandten Forschung soll dieses Testsystem zur Untersuchung der Biotransformation von Wirkstoffen eingesetzt werden. Dies erfolgte zunächst anhand von drei potentiellen Arzneistoffen, deren Biotransformationsmuster in der Ratte und in

Rattenhepatozyten aufgeklärt wurde. Die Substanzen unterschieden sich hinsichtlich ihrer strukturellen, physiko-chemischen und reaktiven Eigenschaften drastisch. Damit wurde in dieser Hinsicht ein relativ breites Substratspektrum eingesetzt, was die Aussagekraft zur Eignung des Modells erhöht.

Der Wirkstoff AWD 100-041 wurde in Hep G2-Zellkulturen wie in Rattenhepatozyten am Thiolrest methyliert. Anschließend erfolgte die Oxidation des Schwefels zum Sulfoxid und schließlich zum Sulfon. Eine CYP-vermittelte Ringhydroxylierung und anschließende Konjugation der Phenolgruppe fand im Gegensatz zur Hepatozytenkultur nicht statt. Aus der Muttersubstanz kann nichtenzymatisch das entsprechende Disulfid entstehen, was durch Inkubation ohne Zellen nachweisbar war. Die Hep G2-Kultur zeigte sich durch die fehlende Hydroxylaseaktivität den Hepatozyten unterlegen. Aufgrund eigener Untersuchungen sowie von Angaben aus der Literatur über die Biotransformation von Coumarin und Anilin [87] ist die fehlende bzw. geringe Hydroxylaseaktivität der Hep G2-Zellen bekannt.

Bei der Metabolisierung des Wirkstoffes AR 12463 konnten in der Hep G2-Zellkultur 3 Metaboliten gefunden werden. Im Gegensatz dazu wird in Rattenhepatozyten die Substanz zu insgesamt 6 Metaboliten verstoffwechselt, von denen 2 Produkte mengenmäßig vorherrschen. Von diesen Hauptmetaboliten M4 und M5 wird nur M4 auch in Hep G2-Zellen gebildet. M5 wird möglicherweise schnell weiter abgebaut. Die Konjugation von AR 12463 und seinen Metaboliten entspricht der in Rattenhepatozyten. Allerdings ist diese Aktivität in Hep G2-Zellen geringer.

Die Hauptwege der Metabolisierung von FLM 5011 waren identisch. Der Abbau der Laurylseitenkette erfolgte durch β -Oxidation nach CYP 4 A-vermittelter ω -Hydroxylierung und Carboxylierung. An ω -Hydroxy- und ω -Carboxygruppen sowie der phenolischen Hydroxylgruppe findet Konjugation statt. Die Umwandlung der Oximgruppe in eine Ketogruppe konnte ebenfalls beobachtet werden.

Insgesamt ist festzustellen, daß die Hep G2-Zellen bei der Fremdstoffbiotransformation eine geringere Aktivität aufwiesen. Trotzdem ist es bemerkenswert, daß bei den eingesetzten Wirkstoffen die Hauptwege der Metabolisierung durch diese Zellart aufgeklärt werden können. Obwohl Hepatozyten und Hep G2-Zellen sich in manchen Enzymaktivitäten deutlich unterscheiden und das der Grund für die ausbleibende Bildung bestimmter Metaboliten sein kann, ist doch offensichtlich die überlappende Substratspezifität bestimmter Enzyme, insbesondere von CYP, eine entscheidende Eigenschaft. Überlappenden Substratspezifität heißt, daß sowohl das gleiche Strukturelement von verschiedenen Isoenzymen angegriffen werden kann als auch, daß das gleiche Isoenzym verschiedene Strukturelemente metabolisch verändern kann. Somit ist zumindest in qualitativer Hinsicht mit ähnlichen oder sogar gleichen Biotransformationsmustern in unterschiedlichen Zellkulturen zu rechnen. Hierbei ist auch der analytische Aspekt zu berücksichtigen. Das vermeintliche Ausbleiben eines Metaboliten unter den eingesetzten experimentellen Bedingungen der Aufarbeitung der Kultur bedeutet nicht

immer, daß seine Bildung nicht erfolgte. Bei Produktmengen unterhalb des pg- oder ng-Bereiches erreichen die analytischen Möglichkeiten natürlich ihre Grenzen.

Für die Durchführung von Untersuchungen zur Beeinflussung des Zellwachstums, insbesondere auch unter dem Gesichtspunkt der Ermittlung der Toxizität von Wirkstoffen, sind stark proliferierende Zelllinien besonders gut geeignet. Daher konnten entsprechende Untersuchungen zur Proliferation und Zytotoxizität erfolgreich mit der Hep G2-Zelllinie ausgeführt werden. Um unterschiedliche Aspekte des Wachstums oder der Zellschädigung zu erfassen, sind verschieden methodische Ansätze erforderlich. Daher umfaßten die Testungen die LDH-Bestimmung, die Bestimmung des Proteingehalts sowie des DNA-Gehaltes. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf andere Zellkulturen ist nicht unbeschränkt möglich, denn es konnte beispielsweise festgestellt werden, daß Hep G2-Zellen weniger empfindlich auf Tetrachlorkohlenstoff reagierten als isolierte Hepatozyten der Ratte [68]. Die Untersuchungen wurden an den drei potentiellen Arzneistoffen durchgeführt. Darüber hinaus fanden die Testungen an einem Phytopharmakon sowie an Substanzen, die im Rahmen der Kultivierung und Inkubation verwendet wurden, statt. Neben der Abklärung eines toxischen Potentials galt es daneben, die optimalen Konzentrationen für die Inkubationsansätze bei Biotransformationsstudien zu finden.

Die Wirkstoffe AWD 100-041 und AR 12463 waren relativ zelluntoxisch. In frühen Inkubationszeiträumen konnte eine Zunahme des Proteingehaltes bei gleich bleibendem DNA-Gehalt festgestellt werden, was auf mögliche Induktionsprozesse zurückzuführen ist. Nach größeren Inkubationszeiträumen fand dann eine konzentrationsabhängige Beeinflussung des Zellwachstums statt. Die normale Membranpermeabilität bleibt erhalten.

Die Toxizität der Substanz FLM 5011 war wesentlich höher. Schon bei geringen Konzentrationen zeigten sich deutliche antiproliferative Effekte, obwohl die Beeinflussung der Membran gering war. Die Ursache für die Beobachtung ist möglicherweise im Wirkungsmechanismus der Verbindung zu suchen. Durch Hemmung der 5-Lipoxygenase sinkt die Konzentration des proliferativ wirkenden Produktes der Arachidonsäure 5(S)-HETE, das offensichtlich im Wachstumsgeschehen der Zellen von Bedeutung ist [4]. Nach Inkubation von Hep G2-Zellen mit 5(S)-HETE konnte eine vermehrte Proliferation beobachtet werden.

Die Toxizitäts- und Proliferationsuntersuchungen mit dem *Solanum lycopersicon*-Mazerat zeigten, daß insbesondere das Hauptalkaloid der Droge Tomatin für die Beeinflussung des Zellwachstums verantwortlich ist. Sowohl DNA- als auch Proteingehalt veränderten sich während der Inkubation mit dem Mazerat bzw. dem Alkaloid in ähnlicher Weise. Die Membrantoxizität war allerdings beim Mazerat höher. Dieser Effekt geht auf zusätzliche Inhaltsstoffe zurück, deren membranschädigende Wirkung bekannt ist, wie z. B. Saponine. Das Aglykon Tomatidin, das in Hep G2-Zellkulturen aus Tomatin z. T. entsteht, zeigte in geringen Konzentra-

tionen eine Erhöhung der Proteinsynthese, wobei aber nicht der DNA-Gehalt zunahm.

Die Studien an den eingesetzten Induktoren 3-MC und PB zeigten ein dualistisches Verhalten bei der Beeinflussung des Zellwachstums. In geringen Konzentrationen erhöhte sich deutlich die Proteinsynthese, insbesondere nach Inkubation mit Phenobarbital. Nach längeren Inkubationszeiträumen und höheren Konzentrationen überwogen die toxischen Effekte, die sich durch die Abnahme der Konzentration von Proteinen als auch der DNA zeigten. Der Induktor Clofibrat bewirkt eine Störung der Membranintegrität. Der Proteingehalt der Zellen wurde nicht beeinflusst.

Eine wichtige Frage beim Arbeiten mit Zellkulturen ist der Einsatz von Lösungsmitteln. Schwerlösliche Substanzen müssen vor Inkubation oft mit organischen Lösungsmitteln angelöst werden, damit ihr Einsatz sinnvoll ist. Prinzipiell muß dabei aber mit Einflüssen auf das Zellwachstum und auch auf zellspezifische Leistungen gerechnet werden. Besonderes Augenmerk galt dem Lösungsmittel DMSO, da es meist zum Einsatz kommt. In der Literatur wird ein wachstumshemmender Effekt diskutiert, der auf eine Beeinflussung der Membranfluidität aber auch auf eine DNA-Methylierung zurückgehen kann [34]. An der Hep G2-Zelle zeigt sich ein konzentrationsabhängiges Verhalten. In geringen Konzentrationen, die üblicherweise eingesetzt werden, war DMSO kaum proliferationshemmend. Toxische Effekte wurden erst bei Konzentrationen über 2 % beobachtet.

Bei Zytotoxizitätsuntersuchungen mit dem Lipoxxygenasehemmer FLM 5011 an Hep G2-Zellen wurden bei einigen Zellen morphologische Veränderungen unter dem Mikroskop beobachtet. Die fibroblastoid aussehenden Zellen hatten einen geschrumpften Zelleib, der Zellkern war kondensiert und es zeigte sich ein intensives Membranblebbing. Solche Bilder deuten meistens auf apoptotische Prozesse hin. Daher wurden einige Testungen zum Nachweis des programmierten Zelltods in der Kultur vorgenommen.

FLM 5011 löste in Hep G2-Zellen Apoptose aus. Die Bildung einer „DNA-Leiter“, die Präsenz von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zytoplasmamembran sowie die Aktivität von ICE verwandten Proteasen (FLICE/Caspase-8) sind eindeutige Indikatoren für diesen Prozeß. Diese Parameter konnten in der Zellkultur nachgewiesen bzw. bestimmt werden. Damit kann die Apoptose sicher von der Zytotoxizität abgegrenzt werden. Wie bei der Beeinflussung der Proliferation der Zellen geht der Mechanismus bei der Auslösung der Apoptose auf die Hemmung der Lipoxxygenase durch FLM 5011 zurück. Entscheidend ist hierbei das Verhältnis der Konzentrationen von Arachidonsäure und deren entsprechende Lipoxxygenaseprodukte [54]. Die sinkende Konzentration von 5(S)-HETE nach Lipoxxygenasehemmung dürfte dabei den Ausschlag geben [39]. Wie für andere Lipoxxygenasehemmer auch gezeigt wurde, nehmen unter dem Einfluß der Wirkstoffe die Konzentrationen der für die Signalauslösung verantwortlichen Proteine bcl-2 und bax ab, wodurch ein Überangebot von bax-Dimeren entsteht [104]. Letztere sind für die Aktivierung der Floppasen verantwortlich. Darüber hinaus kommt es zu einer

Aktivierung der Kaskade der ICE-verwandten Proteasen. Die Veränderung der bax/bcl-2-Konzentrationen wird durch das Protein p53 ausgelöst, das nach DNA-Schädigungen vermehrt exprimiert wird. Vermehrte DNA-Schäden treten vor allem nach Inaktivierung der DNA-reparierenden Enzyme, wie z. B. PARP auf. Diese werden wiederum durch die ICE-verwandten Proteasen zerstört, welche durch FLICE (Caspase-8) aktiviert werden. Durch externe Zugabe von 5(S)-HETE zur Kultur konnte die Auslösung von Apoptose durch FLM 5011 unterdrückt werden. Dies unterstreicht die Rolle der 5(S)-HETE-Konzentration bei der Entstehung der Apoptose. Die möglichen Zusammenhänge der Auslösung der Apoptose in Hep G2-Zellen durch FLM 5011 sind in Abbildung 5-1 zusammengefaßt.

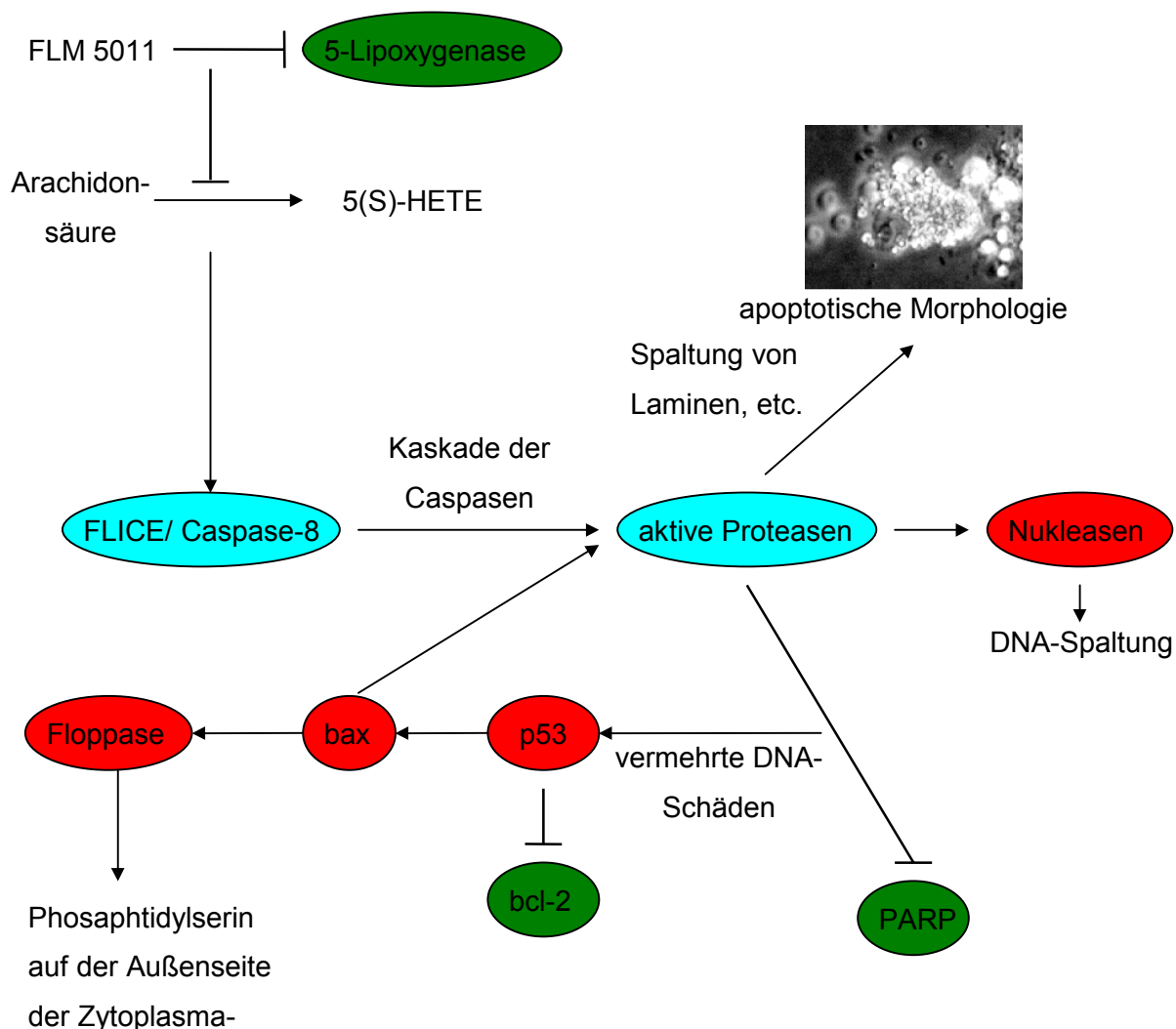


Abbildung 5-1: Auslösung von Apoptose durch FLM 5011 in Hep G2 Zellen

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß die Hep G2-Zellkultur ein brauchbares in vitro-System darstellt. Der Einsatz ist auf sehr vielen Gebieten der Wirkstoffforschung möglich. Insbesondere Fragen des Fremdstoffmetabolismus und der damit im Zusammenhang stehenden Toxizität können erfolgreich bearbeitet werden. Als in vitro-

Testsystem hat die Zellkultur zum Tierversuch sowohl alternativen als auch komplementären Charakter.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte

Sicherheitswerkbank	Tecnoflow Integra Biosciences
Vakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH
Vortexer REAX 2000	Heidolph
CO ₂ -Inkubator	Tecnoflow Integra Biosciences
Umkehrmikroskop mit Photoapparat	Nikon Corporation
Wasserbad	GFL
Massenspektrometer 5890 Serie II und Gas Chromatograph, 5989B	Hewlett Packard
UV-Lampe	CAMAG
HPLC-Gerät LC6-A	Shimadzu
DC-Probenautomat III	CAMAG
HPTLC Scanner II V3.15, PC, CATS 3.15	CAMAG
Kühlzentrifuge ZK380	Hermle
Ultrazentrifuge VP65M	MLW Electronic
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Vakuum Rotationsverdampfer 461 mit Wasserbad	Büchi
Mikrotiterplatten-Photometer Lesetyp EAR 340-AT	SLT Labinstruments

6.2 Substanzen und Kulturzubehör

Kulturmedien und -zusätze	Sigma, USA
Kulturflaschen und Multischalen	Sigma, USA
Sterilfilter	Minisart Sartorius
AWD 100-041	AWD, Dresden
AR 12463	DHW, Rodleben
FLM 5011	Fahlberg List, Freiberg
FLM 5011-Metaboliten	Prof. Dr. Kühn, Institut für Biochemie, Humboldt Universität zu Berlin
Annexin-V-Biotin	Boehringer Mannheim, MD
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Boehringer Mannheim, MD
Diaminbenzidin	Boehringer Mannheim, MD
LDH-Test-Kit	Boehringer Mannheim, MD
DNA-Leiter	GIBCO BRL
ApoAlert FLICE Assay Kit	Clontech Laboratories
Cytodex [®]	Pharmacia, Schweden
Carbogen-Gas (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid)	Technische Gase, Berlin
sonstige Chemikalien	Sigma, USA

6.3 Zellkulturen und Versuchstiere

Hep G2-Zellen wurden bei ATCC, USA käuflich erworben. Hepatozyten und Lymphozyten wurden aus männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150-200g gewonnen. Die Tiere (Tierzucht Schönewalde GmbH, Berlin) erhielten Standardmischfutter (Rezeptur R), und Leitungswasser *ad libitum*. Sie wurden unter Standardbedingungen gehalten. Dazu gehörten Makrolon Standardkäfige, Haltung in einem klimatisierten, abgeschlossenen Raum mit 12h Dunkelphase und Käfigwechsel 1-2mal die Woche.

6.4 Sterilisation

Alle Glasgeräte, wie z.B. Pasteurpipetten, wurden heißluftsterilisiert bei 180°C über 30min. Plastikgefäße, Pipettenspitzen und wäßrige Lösungen wurden bei 121°C für 15min autoklaviert. Thermolabile Lösungen, wie Trypsin-Lösung, Kollagenase-Lösungen und kleine Mengen

wäßriger Lösungen wurden mit Hilfe eines sterilen Membranfilters mit Porengröße 0,2µm sterilfiltriert.

Arbeitsflächen und Hände wurden mit Meliseptol® und anderen Desinfektionsmitteln desinfiziert.

6.5 Kultivierung der Hep G2-Zellen

Hep G2-Zellen wurden in 25cm²- bzw. 75cm²-Polystyren-Kulturflaschen mit 5ml bzw. 15ml Medium kultiviert. Nach 24-72h oder wenn das Phenolrot-haltige Medium eine gelb-orange Farbe aufwies, was auf einen pH unter 7 hinweist, wurde das Medium gewechselt. Dazu wurde das Kulturmedium mittels einer Saugpumpe, an der eine sterile Pasteurpipette mit Schlauch und Auffanggerät befestigt war, restlos entfernt. Nun wurde mit frischem Kulturmedium aufgefüllt.

Bei genügend hoher Zelldichte oder zum Vorbereiten von Versuchen wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und nun mit 1,5ml bei 25cm²- bzw. 2,5ml bei 75cm²-Kulturflaschen einer sterilen Trypsin-EDTA-Lösung 3-5min bei 37°C inkubiert.

Trypsin-EDTA-Lösung:	NaCl	8,0g
	KCl.....	0,2g
	Na ₂ HPO ₄	1,15g
	KH ₂ PO ₄	0,2g
	Phenolrot	0,01g
	Trypsin (1:250)	0,5g
	EDTA.....	0,2g
	in 1000ml destilliertem Wasser	

Die Lösung ohne Trypsin und EDTA entspricht der Formulierung der Salzlösung nach Earl. Die Bezeichnung 1:250 kennzeichnet die Enzymaktivität von Trypsin: 1g Trypsin verdaut bzw. hydrolysiert 250g Caseinsubstrat bei 25°C, in 10min und bei pH 7,6.

Eine Vorinkubation mit einer sterilen EDTA-Lösung war nicht nötig. Wenn die Zellen sich durch leichtes Rütteln der Kulturflasche vom Substrat gelöst hatten, wurden sie in der 3-fachen Menge an Kulturmedium suspendiert und bei Bedarf gezählt mit einem Casy-Zellzählgerät. Die Zellsuspension konnte nun auf mehrere neue Kulturgefäße verteilt werden. Nach 24h wurde das Kulturmedium entfernt und durch frisches ersetzt. Eine Passage wurde ca. einmal pro Woche durchgeführt.

Zur Erstellen einer Wachstumsumskurve wurden 10⁵ Zellen pro well in 24well-Multischalen eingesät. Nach 4h fand in allen Kulturen ein Mediumwechsel statt. Anschließend wurden 5

Kulturen ohne weiteren Wechsel des Mediums kultiviert, während 5 weitere Kulturen nach jeweils 24h frisches Medium bekamen.

6.5.1 Medium und Kultivierungsbedingungen

Die Zellkulturen wurden mit leicht geöffneter Kappe der Kulturflaschen in einem CO₂-Inkubator mit 5% CO₂ in der Gasphase und bei 37°C kultiviert. Eine hohe Luftfeuchtigkeit wurde durch Füllen des Wasserbeckens des Inkubators mit destilliertem Wasser gewährleistet.

Das Kulturmedium für Hep G2-Zellen hatte folgende Zusammensetzung:

- RPMI 1640 Medium 400,0ml
ohne L-Glutamin und NaHCO₃
- Medium 199 100,0ml
mit Hank's Salzen, mit L-Glutamin und ohne NaHCO₃
- L-Glutamin-Lösung 10,0ml
200mM
- MEM nichtessentielle Aminosäure-Lösung 5,0ml
890,0mg/l L-Alanin, 1500,0mg/l L-Asparagin H₂O,
1330,0mg/l L-Asparaginsäure, 1470,0mg/l L-Glutaminsäure,
750,0mg/l L-Glycin, 1150,0mg/l L-Prolin, 1050,0mg/l L-Serin
- Natriumpyruvat-Lösung 5,0ml
100mM
- Penicillin/Streptomycin-Mischung 10,0ml
(10000 Einheiten Penicillin und 10000µg Streptomycin
pro ml in physiologischer Kochsalzlösung)
- NaHCO₃ 0,6g
gelöst in 20ml destilliertem Wasser und sterilfiltriert
- fetales Kälberserum 50ml

Bei Versuchen mit photometrischer Detektion wurde das Medium aus RPMI 1640- und Medium 199-Formulierungen hergestellt, die kein Phenolrot enthielten. Bei fluorimetrischen Bestimmungen störte Phenolrot nicht.

6.5.2 Kultivierung an Cytodex®

300mg Cytodex®3 Microcarrier wurden in 30ml Phosphatpuffer (PBS) 3h bei 20°C hydratisiert. Nach anschließendem Dekantieren und Waschen der Microcarrier, wurden diese in 10ml PBS autoklaviert. Jeweils 2ml dieser Suspension wurden in einem 100ml Kolben auf 20ml mit einer Zellsuspension in Kulturmedium aufgefüllt, so daß 10^6 Zellen 1ml Microcarrier-Suspension zur Verfügung stand. Mit leicht geöffnetem Verschuß des Kolbens wurde die Zellkultur im CO₂-Inkubator kultiviert, wobei alle 20min geschwenkt wurde, um ein gleichmäßiges Anwachsen und einen kontinuierlichen Gasaustausch zu gewährleisten [80]. Nach 4h wurde das Kulturmedium nach Sedimentation der Microcarrier entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Während der Versuche wurden die Kulturen in einem temperierbaren Schüttler inkubiert, nachdem sie mit CO₂ begast wurden. So konnte eine gleichmäßige Verteilung des Substrats gewährleistet werden.

Phosphatpuffer (PBS):KCl	0,2g/l
KH ₂ PO ₄	0,2g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,1g/l
NaCl	8,0g/l
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2,16g/l

6.6 Kultivierung der Hepatozyten

6.6.1 Isolation

Die Isolierung der Hepatozyten aus der Ratte erfolgte in Anlehnung an die Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik nach Seglen [93].

Der Bauchraum der narkotisierten Wistar-Ratte (Urethan 1mg/kgKG i.p.) wurde geöffnet und in die freigelegte Pfortader eine Flexüle eingeführt, die dann mit einem chirurgischen Faden fixiert wurde.

Die Flexüle war über eine zwischengeschaltete Blasenfalle und einer Schlauchpumpe mit dem auf 37°C temperierten Vorratsgefäß verbunden.

Als erstes wurde die Leber mit Ca²⁺-freien Medium für 10min mit einer Durchflußrate von 15 ml/min perfundiert, wodurch die Leber vollständig entblutet wurde. Nach ca. 10s wurde die untere Hohlvene durchtrennt, um Verstopfungen von einzelnen Leberlappen durch Blutgerinnsel zu vermeiden.

Ca²⁺-freies Perfusionsmedium:

NaCl.....	8,0g
KCl.....	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Phenolrot.....	0,01g
HEPES.....	100mM
destilliertes Wasser.....	ad 1,00 l

Im zweiten Schritt erfolgte nun die enzymatische Gewebedissoziation mit einer Kollagenase-Lösung. Hierbei wurde ca. 8-10 min perfundiert.

Kollagenaselösung:

Kollagenase	50 mg
Calciumchlorid.....	110 mg
Perfusionsmedium	ad 100 ml

Die Leberkapsel wurde dann in einen sterilen Kolben mit Kulturmedium überführt und gewaschen, um noch an der Oberfläche haftendes Blut und Haare zu entfernen. Dann wurde sie vorsichtig mit Skalpell und Schere geöffnet und zerkleinert. Dauernde Eiskühlung, sowie Vorkühlung des Kulturmediums, war hierbei notwendig. Die grobe Zellsuspension wurde nun durch ein grobmaschiges Perlonsieb gegossen, um noch verbliebene Leberstücke abzutrennen. Die Zellsuspension wurde zweimal für 10min auf Eis stehengelassen, damit es zu einer Sedimentation der Zellen kam und um überstehendes Kulturmedium mit Zelltrümmern und anderen Verunreinigungen absaugen und durch frisches ersetzen zu können.

Nun wurden die Zellen mit Hilfe des Casy-Zellzählgerätes gezählt und die Vitalität durch die Trypanblau-Färbung bestimmt.

Dazu wurde das Deckglas eines Hämozytometers, welches angefeuchtet wurde, fest auf die Zählfläche gedrückt. In einem Eppendorfgeläß wurden 50µl Trypanblaulösung, 30µl Kulturmedium und 20µl Zellsuspension gemischt. Ein Tropfen dieser Mischung wurde an das Hämozytometer herangeführt. Durch Kapillarkräfte fließt eine konstante Menge unter das Deckblatt. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Menge an gefärbten und ungefärbten Zellen gezählt. Die durchschnittliche Vitalität lag bei 60-80%. Zellsuspensionen mit einer Vitalität unter 50% wurden verworfen oder über Histopaque[®] mit der Dichte $\rho = 1,077\text{g/cm}^2$ (Polysucrose 5,7g/dl und Natriumditrizoat 9g/dl) bei 50g für 10min bei 0°C zentrifugiert, um vitale und geschädigte Zellen voneinander zu trennen. Die vitalen Zellen sammelten sich an der Grenzschicht und wurden nach der Trennung noch zweimal gewaschen [34].

Trypanblau-Lösung:

NaCl..... 0,15M

Trypanblau 0,4g

Aqua bidest..... ad 100ml

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt.

2×10^5 vitale Zellen wurden je well in eine 24well-Multischale ausgesät, die zuvor mit Kollagen beschichtet wurde. Nach 24h wurden die Zellen, die sich nicht angeheftet hatten entfernt und das Kulturmedium erneuert.

6.6.2 Medium und Kultivierungsbedingungen

Zur Kultivierung der Rattenhepatozyten wurde das gleiche Medium wie für Hep G2-Zellen verwendet. Um eine bessere Anheftung der Hepatozyten an das Substrat zu gewährleisten, wurden folgende Zusätze während der Phase des Anheftens der Zellen zu dem Kulturmedium gegeben [7]:

- Insulin..... 0,3 μ M
- Dexamethason 0,1 μ M
- Phenobarbital 0,8mM

Damit es überhaupt zu einer Anheftung der Zellen kam, wurden die Kulturgefäße mit Kollagen beschichtet. Dazu wurden 0,17ml einer sterilen Kollagen I-R-Lösung gleichmäßig über den Boden eines wells einer 24well-Multischale verteilt. Danach wurden 0,04ml einer sterilen NaOH-Medium Mischung (0,34M NaOH und Kulturmedium 1:2) hinzupipettiert und durch schwenken verteilt. Nach 15-30min war das Kollagen geliert und wurde mit 1ml Kulturmedium überschichtet und 24h im Brutschrank vorinkubiert. Vor der Zugabe der Zellsuspension, wurde das Medium entfernt.

Die ausgesäten Zellen wurden mit 2ml Kulturmedium pro well kultiviert. Ansonsten galten die Kulturbedingungen, wie sie in 6.5.1 beschrieben wurden.

6.7 Kultivierung der Lymphozyten

6.7.1 Isolation

Die Milz wurde nach Entnahme aus der toten Ratte sofort in eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gegeben. Überflüssiges Fettgewebe wurde mit Schere und Skalpell entfernt. Mit Hilfe eines Pistills wurde das Organ zerdrückt und durch ein grobes Nylonsieb gepreßt. Das so entstandene Milzhomogenat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10ml aufgefüllt und über 6ml Histopaque® in einem Zentrifugengefäß geschichtet. Es wurde 30min bei Raumtemperatur bei 400g ohne abzubremesen zentrifugiert. Der Überstand über der Interphase wurde verworfen. Die undurchsichtige Interphase wurde in ein sauberes Zentrifugengefäß pipettiert und mit 10ml Kulturmedium versetzt. Anschließend wurde wiederum bei 400g 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl und die Vitalität (siehe 6.6.1) wurden bestimmt. Je nach Ausbeute wurde durch Verdünnen mit Medium eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt.

6.7.2 Medium und Kultivierungsbedingungen

Das Kulturmedium für die Lymphozyten hatte folgende Zusammensetzung:

- fetales Kälberserum..... 50ml
- HEPES 25mM
- RPMI 1640-Medium..... ad 500ml

Die Lymphozyten wurden in einem temperierbaren Schüttler bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Als Kulturgefäße kamen 25cm²-Kulturflaschen zum Einsatz.

6.8 Modellreaktionen

Alle Substrate, die bei der Durchführung der Modellreaktionen zur Anwendung kamen, wurden in DMSO gelöst. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Gesamtkonzentration von DMSO im Medium niemals 0,5% überschritten wurde (siehe 4.1.2.8).

Am Ende der Inkubationszeiten wurden bei jedem Versuch die Zellen gezählt, da bei langen Inkubationszeiten (48 und 72h) ein Wachstum zu erwarten war, das nicht vernachlässigt werden konnte. Für Versuche, bei denen photometrisch detektiert wurde, wurde farbloses Medium, also

Medium ohne Phenolrot eingesetzt.

6.8.1 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung

Das Kulturmedium wurde mit 8nmol/ml 7-Ethoxyresorufin und 10nmol/ml Dicumarol, um eine weitere Metabolisierung von entstandenem Resorufin durch das zytosolische Enzym Diaphorase zu schützen, versetzt. Proben wurden nach 1, 4, 24, 48 und 72h entnommen. Freies unkonjugiertes Resorufin konnte direkt in der Probe fluorimetrisch bei einer Excitationswellenlänge von 530nm und einer Emissionswellenlänge von 583nm vermessen werden. Um die Gesamtmenge an entstandenem Resorufin zu bestimmen, wurden 1ml Proben mit 0,25ml 0,1M Essigsäure-Natriumacetat-Puffer (pH 4,5) und 50µl β -Glucuronidase/Sulfatase-Gemisch (100000Units/ml bzw. 5000Units/ml) versetzt und mindestens 2h bei 37°C inkubiert. Proteine wurden danach durch Zugabe von 3ml 96% Ethanol gefällt und bei 10000g 2min abzentrifugiert. Der Überstand konnte nun fluorimetrisch vermessen werden [22].

Kalibrierungskurven wurden sowohl für die Bestimmung von freiem Resorufin als auch für die Bestimmung an insgesamt entstandenem Resorufin erstellt und mittels linearer Regression ausgewertet.

Die Konzentrationen betrugen 0,4, 0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4,0, 4,8, 5,6, 6,4, 7,2 und 8µmol/ml Resorufin in Medium für die Bestimmung an freiem Resorufin. Für die Bestimmung an entstandenem Gesamtresorufin wurden Standardlösungen mit 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 und 8,0 µmol/ml Resorufin herangezogen. Die Proben wurden wie oben beschrieben behandelt.

6.8.2 7-Ethoxycoumarin-O-deethylierung

Das Kulturmedium wurde mit 250nmol/ml 7-Ethoxycoumarin versetzt. Die 2ml Proben wurden nach 1, 4, 24, 48 und 72h entnommen und sofort auf Eis gekühlt. 7ml eiskalter Ether, der mit 1,5ml Isoamylalkohol versetzt wurde, wurden zu den Proben gegeben, die nun auf dem Vortexer 1min vermischt wurden. 5ml der Etherphase wurden zu 3,5ml 0,2M Glycin/NaOH-Puffer (pH10,4) gegeben und erneut auf dem Vortexer gemischt. Die eisgekühlte wässrige Phase konnte nun fluorimetrisch bei einer Excitationswellenlänge von 366nm und einer Emissionswellenlänge von 452nm vermessen werden.

Zur Bestimmung der Konjugate wurde die wässrige Phase nach der Etherextraktion mit 0,25ml 0,1M Essigsäure-Natriumacetat-Puffer (pH 4,5) und 50µl β -Glucuronidase/ Sulfatase-Gemisch versetzt und mindestens 2h bei 37°C inkubiert. Dann wurde wie oben beschrieben verfahren.

Zur Quantifizierung wurde ein Standard von 10,5 nmol/ml 7-Hydroxycoumarin in Glycin/NaOH-Puffer vermessen und die Wiederfindungsrate bestimmt [17].

6.8.3 Aminophenazon-N-demethylierung

Der bei der oxidativen Demethylierung von Aminophenazon entstandene Formaldehyd wurde nach der Methode von Nash quantifiziert [75].

Das Kulturmedium wurde mit 0,322µmol/ml Aminophenazon und 0,338µmol/ml Semicarbazid-HCl, um entstandenen Formaldehyd vor einer weiteren Verstoffwechselung zu CO₂ zu schützen, versetzt. Die 0,5ml Proben wurden nach 4, 24, 48 und 72h entnommen und mit 0,4ml 12% ZnCl₂-Lösung und 0,2ml gesättigter Ba(OH)₂ Lösung zwecks Proteinfällung versetzt. Bei 10000g wurden für 5min die Proteine abzentrifugiert. 1ml des Überstands wurden dann mit 0,4ml doppelt starkem Nash-Reagenz, welches aus 100ml 0,4% wäßriger Acetylacetonlösung bestand, die 30g Ammoniumacetat und 0,6ml Essigsäure enthielt, versetzt. Die Proben wurden im Wasserbad für 30min auf 60°C erhitzt, schnell auf Eis abgekühlt und dann nochmals zentrifugiert. Die Proben wurden bei 420nm photometrisch gegen einen Leerwert, der aus einer unbehandelten Zellkultur entnommen wurde, vermessen.

Die Kalibrierungskurve wurde mit gleich behandelte Proben mit den Konzentrationen 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 0,8 und 0,1µmol/ml Formaldehyd erstellt und mittels linearer Regression ausgewertet.

6.8.4 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion

Das bei der Azoreduktion von DAB entstandene 4-(N,N-Dimethylamino)anilin wurde mit der Methode von Huang et al. [45] bestimmt. Bei der Reduktion von DAB können auch andere Metaboliten entstehen, die bei dieser Methode nicht erfaßt werden. Daher stellt diese Methode keine Quantifizierung der absoluten reduktiven Aktivität dar.

Das Kulturmedium wurde mit 0,2µmol/ml DAB versetzt und 0,5ml Proben wurden nach 1, 2, 4 und 24h entnommen. 0,1ml 0,5M NaOH-Lösung wurde zu den Proben gegeben und dann mit 1,0ml Hexan auf dem Vortexer für 30s durchmischt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die Hexanphase entfernt und die Probe wurde erneut mit 1ml Hexan extrahiert. Die Hexanphasen wurden vereinigt und 1ml der Hexanphase wurde mit 1ml 0,1M Essigsäure/Natriumacetatpuffer (pH4) wie oben beschrieben extrahiert. Die Hexanphase wurde nun verworfen und die wäßrigen Phase wurde mit 10µl Fluorescaminlösung (2mg Fluorescamin in 1ml wasserfreiem Aceton) versetzt. Nach 30min konnte das entstandene Fluorescaminderivat bei einer Excitationswellenlänge von 410nm und einer Emissionswellenlänge von 500nm fluorimetrisch bestimmt werden.

Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierungskurve mit wie oben behandelten Proben unterschiedlicher Konzentrationen 4-(N,N-Dimethylamino)anilin erstellt und durch lineare Regression ausgewertet.

6.8.5 p-Nitrophenol-Konjugation

Mittels Quantifizieren des nicht konjugierten Anteils durch Bildung des gelb gefärbten Phenolatanions wurde die Konjugation von p-Nitrophenol indirekt bestimmt.

Dem Medium wurden 0,25µmol/ml p-Nitrophenol zugesetzt und Proben wurden nach 4, 24, 48 und 72h entnommen.

Zu 0,1ml Probe wurden 0,9ml Trichloressigsäure gegeben, um die in der Probe enthaltenen Proteine zu fällen. Nach 5min Zentrifugation bei 10000g wurden 0,4ml des Überstandes entfernt und mit 1ml 0,5M NaOH versetzt und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei 405nm gegen einen mitgeführten Leerwert vermessen.

Eine Kalibrierungskurve wurde mit analog behandelten Nitrophenollösungen der Konzentrationen 0,15, 0,30, 0,45, 0,6, 0,75 und 0,9µmol/ml erstellt und mittels linearer Regression ausgewertet.

6.8.6 Bestimmung der Enzymaktivitäten in Ultraschall-behandelten Zellkulturen

Nach Kultivierung der Hep G2-Zellen in 24well-Platten wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit eiskaltem 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen. In jedes well wurden 0,5ml Phosphatpuffer pipettiert, die Kulturen auf Eis gestellt und jedes well 15s mit Ultraschall mit Hilfe eines Ultraschallstabes (30W/cm²) behandelt. Nun wurden pro well 0,5ml Reaktionspuffer hinzugesetzt und die Reaktion durch Zugabe des Substrats gestartet. Die Konzentrationen und die Bestimmungen der Enzymaktivität wurden gewählt, wie unter 6.8.1-6.8.5 beschrieben wurde.

Reaktionspuffer: NADP 0,6mg
Glucose-6-phosphat..... 0,365mg
MgCl₂ 6 H₂O 3,25mg
Nicotinsäureamid 40µmol

6.8.7 Bestimmung der Enzymaktivitäten in isolierten Zellorganellen von Hep G2-Zellen

Nach Kultivierung der Hep G2-Zellen wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit eiskaltem 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen. Die Zellen wurden nun mit einem *cellscraper* vom Substrat gelöst, in 1,15% eiskalter KCl-Lösung suspendiert und mittels Potter-Elvehjem

homogenisiert (5x in 15s bei 1500 Umdrehungen/min). Zum Abtrennen von Zelltrümmern und Kernen wurde zuerst 10min bei 1000g bei 0°C zentrifugiert, danach, um eine Trennung von Rohmitochondrien und Mikrosomen zu erreichen, wurde bei 9000g 30 min bei 0°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet, welches nun die Rohmitochondrien enthielt, wurde in 5ml Phosphatpuffer suspendiert und mit Hilfe des Potter-Elvehjem wiederum homogenisiert. Das Homogenat wurde über einen Dichtegradienten 2h bei 2000g zentrifugiert, um eine Mitochondrien- und eine Lysosomen/ Peroxysomen-Fraktion zu erhalten. Die Lösungen für den Gradienten enthielten 0,8, 1,0 und 1,2mol/l Saccharose in Phosphatpuffer. Das Pellet enthielt nun die Mitochondrien, während die Lysosomen und Peroxysomen als milchige Schicht im Gradienten erschienen. Eine Auftrennung von Lysosomen und Peroxysomen erfolgte nicht. Die Fraktionen wurden jeweils in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen.

Der 9000g-Überstand wurde zwecks Trennung der Mikrosomen vom Zytosol der Ultrazentrifugation bei 105000g für 60min bei 4°C unterzogen. Die entstandene Mikrosomenfraktion wurde ebenfalls in Phosphatpuffer suspendiert. Vor der Messung der Enzymaktivitäten wurden alle Fraktionen unter Eiskühlung mittels Ultraschallbehandlung (1min 30W/cm²) aufgeschlossen.

Die Inkubationsansätze für die Bestimmung der Enzymaktivität enthielten jeweils 1ml Reaktionspuffer 1 bzw. 2 und 1ml der Fraktion. Die Bestimmung wurde gestartet durch Zugabe der Substrate in den gleichen Konzentrationen, wie unter 6.8.1- 6.8.5 beschrieben wurde.

Der Reaktionspuffer für die Bestimmung der Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin, 7-Ethoxycoumarin und Aminophenazon hatte folgende Zusammensetzung:

Reaktionspuffer 1:NADP	0,6mg
Glucose-6-phosphat.....	0,365mg
MgCl ₂ 6 H ₂ O	3,25mg
Nicotinsäureamid	40µmol
Glucose-6-phosphatdehydrogenase....	1U
0,1M Phosphatpuffer pH7,4	ad 1ml

Bei der Azoreduktion von DAB wurde statt NADP NADPH eingesetzt.

Der Reaktionspuffer zur Untersuchung der Konjugation von p-Nitrophenol war folgendermaßen zusammengesetzt:

Reaktionspuffer 2: EDTA.....	10µmol
UDP-Glucuronsäure	1,66µmol
0,1M Phosphatpuffer pH 7,4.....	ad 1ml

Die Reaktionen wurden nach 1h gestoppt durch Eiweißfällung oder durch sofortige Extraktion des Produkts. Die Bestimmungen wurden wie unter 6.8.1-6.8.5 beschrieben durchgeführt.

6.9 Statistische Auswertung

Bei der Bestimmung der Enzymaktivität in Hep G2-Zellen und Hepatozytenkulturen mittels Modellreaktionen wurden mindestens 6 Meßwerte, die aus unterschiedlichen Kulturen gewonnen wurden, zur Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung herangezogen. Ausreißer wurden mit dem Test nach Grubbs eliminiert. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Schnelltest nach David et al. durchgeführt. Anschließend fand ein Vergleich der Varianzen mit Hilfe des F-Tests statt. Die Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte erfolgte mittels t-Test nach Student. Bei der Bestimmung der Zytotoxizität bzw. Proliferation wurden auf Grund der Verwendung von Mikrotiterplatten 8 Werte erhalten, die zur Berechnung genutzt wurden. Bei der Signifikanztestung wurden die Ergebnisse mit dem Blindwert, also mit dem Ergebnis unbehandelter Kulturen verglichen.

6.10 Biotransformation von potentiellen Arzneistoffen

6.10.1 AWD 100-041

6.10.1.1 Gewinnung der Metaboliten

10⁷ Hep G2-Zellen wurden mit 0,05mg/ml AWD 100-041 in 15ml Medium 72h inkubiert. Das Medium mit den Zellen, die mit einem *cellscraper* entfernt wurden, wurde auf pH 4,8 eingestellt und mit 0,25ml eines β -Glucuronidase/Sulfatase-Gemisches versetzt. Nach 2h wurde das Medium jeweils 3mal bei pH 3 und pH 9 mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und in Methanol aufgenommen.

6.10.1.2 Isolation und Identifikation der Metaboliten mittels HPLC

Die Trennung der Metaboliten erfolgte mit Hilfe von reverse-phase HPLC (LC6-A, Shimadzu) mit einer RP-18 Säule (Merck). Dabei wurden 2 Gradientensysteme eingesetzt:

- 1.Gradientensystem 0-2min Wasser/Methanol 50/50
 2-10min zu Wasser/Methanol 0/100
- 2.Gradientensystem 0-10min von Wasser/Methanol 50/50 zu Wasser/Methanol 5/95

10-15min zu 0/100% Wasser/Methanol

Mit Hilfe des 1. Gradientensystems wurden die Metaboliten getrennt und die Metabolitenfraktionen durch photometrische Detektion bei 311nm gewonnen. Diese wurden eingengt und wiederum für die HPLC genutzt. Sowohl für das 1. als auch das 2. Gradientensystem wurden die Retentionszeiten und die Spektren der Metaboliten bestimmt und mit Vergleichsmetaboliten verglichen. Zusätzlich fand eine Co-Chromatographie statt.

6.10.1.3 Identifikation der Metaboliten mittels DC

Die eingengten Fraktionen, die bei der HPLC gewonnen wurden, wurden für die DC eingesetzt. Es wurden Silica Gel Dünnschichtplatten ohne Fluoreszenzindikator benutzt und die Methanolextrakte wurden bandenförmig aufgetragen. Zusätzlich fand eine Co-Chromatographie mit den Vergleichssubstanzen statt. Da AWD 100-041 und seine Metaboliten eine starke Eigenfluoreszenz bei 366nm aufweisen, konnte auf die Detektion mittels Fluoreszenzlöschung verzichtet werden (Nachweisgrenze 1µg [57]).

Folgende Fließmittel kamen zur Anwendung:

- | | | |
|----------------|------------------------|----------|
| 1. Fließmittel | Chloroform/Methanol | 95:5 |
| 2. Fließmittel | Toluen:Aceton:Methanol | 70:20:10 |

6.10.1.4 Identifizierung der Metaboliten mittels MS

Die Massenspektren der Metaboliten von AWD 100-041 wurden im Fachinstitut für angewandte Analytik und Umweltchemie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Dr. M. von Löwis of Menar erstellt. Als Gerät kam ein Hewlett Packard 5995A mit Direkteinlaßsystem (Elektronenstoßionisation, Ionenquellentemperatur 140-175°C, Elektronenenergie 70eV) zum Einsatz.

6.10.2 AR 12463

6.10.2.1 Gewinnung der Metaboliten

10⁷ Hep G2-Zellen, die mit 0,8µM Phenobarbital 72h vorbehandelt wurden, wurden mit 0,05mg/ml AR 12463 in 15ml Medium für 72h kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen mittels eines *cellscraper* gelöst und mit dem Medium vereinigt.

Nach Einstellen des pH auf 4,8 und nach Zugabe von 0,25ml eines β-Glucuronidase/ Sulfatase-

Gemisches wurde 24h inkubiert, um mögliche Konjugate zu spalten. Nun wurde der pH auf 9 eingestellt und das Medium drei mal mit 30ml Chloroform extrahiert. Nach Entfernen des Chloroforms am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen.

6.10.2.2 Isolation und Identifikation der Metaboliten mittels HPLC

Die Trennung der Metaboliten und die Gewinnung der einzelnen Fraktionen erfolgte wie unter 6.10.1.2. Auch hier wurden die Metaboliten einer Co-Chromatographie mit Vergleichssubstanzen unterzogen. Die Detektion der Metaboliten erfolgte bei 250 und 280nm. Es wurden zusätzlich Spektren aufgenommen.

6.10.2.3 Identifikation der Metaboliten mittels DC

Die eingeeengten Fraktionen, die bei der HPLC gewonnen wurden, wurden auch für die DC eingesetzt. Hierbei wurden Silica Gel F₂₅₄ Dünnschichtplatten benutzt und die Methanolextrakte wurden bandenförmig aufgetragen. Es fand ebenfalls eine Co-Chromatographie mit den Vergleichssubstanzen statt, wobei bei 254nm mittels Fluoreszenzlöschung detektiert wurde.

Folgende Fließmittel kamen zur Anwendung:

Fließmittel	Chloroform/Methanol/Eisessig	85:13:2
Fließmittel	Chloroform/Methanol/konzentrierter Ammoniak	85:14:1

6.10.2.4 Identifikation der Metaboliten mittels von GC/MS

Zur Identifizierung der Metaboliten mittels GC/MS wurden die gewonnenen Einzelfraktionen eingesetzt. Die Untersuchungen fanden unter folgenden Bedingungen statt:

- HP-5 MS, 30m, Innendurchmesser 250µm, Filmdicke 0,25µm
- Aufheizung von 180 auf 300°C mit 10°C pro Minute
- Split 1:20
- 70eV
- 70EI
- Massenscan 40-500

6.10.3 FLM 5011

6.10.3.1 Gewinnung der Metaboliten

2×10^7 Hep G2 Zellen wurden mit 25 µg/ml FLM 5011 mit 150 ml Medium 72 h inkubiert. Das Medium mit den Zellen, die mit einem *cellscraper* entfernt wurden, wurde auf pH 4,8 eingestellt und mit 0,25 ml eines β -Glucuronidase/Sulfatase-Gemisches (siehe 6.8.1) versetzt. Nach 2 h wurde das Medium 3 mal bei pH 3 und 3 mal bei pH 9 mit einem Chloroform/Isopropanol-Gemisch (3:1) extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotations-verdampfer eingeeengt und in Methanol aufgenommen.

6.10.3.2 Isolation und Identifikation der Metaboliten mittels HPLC

Die Trennung der Metaboliten erfolgte wie unter 6.10.1.2 beschrieben. Die Metaboliten wurden bei 312 nm, ein Absorptionsmaximum der Oxim-Metaboliten, und bei 330 nm, ein Absorptionsmaximum der Keton-Metaboliten, detektiert. Zusätzlich wurden Spektren aufgenommen. Die Co-Chromatographie fand unter gleichen Bedingungen statt.

6.10.3.3 Identifikation der Metaboliten mittels DC

Die eingeeengten Fraktionen, die bei der HPLC gewonnen wurden, wurden auch hier für die DC eingesetzt. Es wurden Silica Gel F₂₅₄ Dünnschichtplatten benutzt und die Methanolextrakte wurden bandenförmig aufgetragen. Zusätzlich fand eine Co-Chromatographie mit den Vergleichssubstanzen statt. Detektiert wurden die Substanzen durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und durch Eigenfluoreszenz bei 366 nm, wobei die Metaboliten mit einer Oximgruppe eine blaue und die mit einer Ketongruppe eine bräunliche Fluoreszenz aufwiesen und so leicht voneinander unterschieden werden können.

Folgende Fließmittel kamen zur Anwendung:

- | | | |
|----------------|---------------------------------|----------|
| 1. Fließmittel | Toluol/Methanol | 95:5 |
| 2. Fließmittel | Chloroform/Acetonitril/Methanol | 80:10:10 |
| 3. Fließmittel | Toluol/Ethylacetat | 85:15 |

6.10.3.4 Identifizierung der Metaboliten mittels MS

Die Aufnahme der Massenspektren wurde wie unter 6.10.1.4 durchgeführt.

6.10.3.5 Bestimmung der Umsatzrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden 25µg/ml FLM 5011 in 150ml Kulturmedium gelöst und entsprechend 6.10.3.1 extrahiert und aufgearbeitet. Das methanolische Extrakt der Wiederfindungsraten, die Proben, sowie FLM 5011-Standardlösungen zum Erstellen einer Kalibrierungsgeraden wurden mit Hilfe des CAMAG DC-Probenautomats auf 10x10cm HPTLC-Kieselgel-60-Platten ohne Fluoreszenzindikator aufgesprüht. Die HPTLC-Platten wurden in einer Horizontalkammer mit Fließmittel 2 entwickelt. Mit dem CAMAG Scanner wurde bei einer Wellenlänge von 316nm die Absorptionen gemessen und über die Peakflächen eine Kalibrierungsgerade erstellt und der FLM 5011 Gehalt in den Proben errechnet. Dies erfolgte mit Hilfe des CAMAG Auswerteprogramms CATS Version 3.15.

Ebenso wurde bei AWD 100-041 und AR 12463 verfahren, wobei für letzteres keine Umsatzrate bestimmt werden konnte, da es nicht-enzymatisch fast vollständig zu einem Disulfid umgewandelt wurde, welches in keinem Lösungsmittel löslich war.

6.11 Zytotoxizitätsbestimmungen

6.11.1 Der Amidoschwarztest

Die kultivierten Hep G2-Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet und nach Zählung mit dem Casy-Zellzählgerät in Medium suspendiert und auf eine Zelldichte von 10^5 Zellen/ml eingestellt. Durch Schütteln wurden die Zellen am Sedimentieren gehindert. Danach wurden jeweils 100µl Zellsuspension pro well in eine Flach-Boden-96well TC Mikrotiterplatte pipettiert und die Zellen 24h kultiviert. Die zu prüfenden Substanzen wurden mit Hilfe von DMSO in Medium gelöst und 100µl dieser Substanzlösungen wurden in jedes well pipettiert. Nun wurde 4, 24 oder 72h inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium vorsichtig entfernt und zwecks Fixierung der Zellen in jedes well 100µl Acetat-gepufferte Formaldehydlösung (10% Formaldehyd in 0,1M Natriumacetat/Essigsäure-Puffer, pH 3,5) gegeben. Nach 15min wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt.

Zur Färbung der Zellproteine wurde jedes well mit 100µl Amidoschwarz-Lösung (100mg Amidoschwarz 10B in 100ml 0,1M Natriumacetat/Essigsäure Puffer pH 3,5 gelöst und filtriert) versetzt. Die Farbstofflösung wurde nach 30min restlos entfernt.

Um nicht absorbierten Farbstoff auszuschwemmen, wurde jedes well mit 150µl HCl-angesäuertem Wasser (pH 3,5-5) gewaschen.

Durch Zugabe von 150µl 50mM NaOH pro well wurde die proteingebundene Farbe eluiert und

durch 10min Schütteln auf einem Plattenschüttler homogenisiert.

Die Absorption wurde mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Dabei wurde die Absorption bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von Amidoschwarz 10B (620nm) und die Absorption bei der Wellenlänge des Absorptionsminimums (450nm) voneinander abgezogen.

6.11.2 Der LDH Test

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurde das Cytotoxicity Detection Kit von Boehringer Mannheim eingesetzt.

Die kultivierten Hep G2-Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet und nach Zählung mit dem Casy-Zellzählgerät in Medium suspendiert und auf eine Zelldichte von 10^5 Zellen/ml eingestellt.

Nun wurden 200µl Zellsuspension pro well in 96well-Mikrotiterplatten eingesät und 24h kultiviert. Das Medium wurde nun entfernt und durch 200µl Medium ersetzt, das die zu prüfenden Substanzen enthielt. Nach 24h Inkubation wurden 100µl Überstand entnommen, in eine andere 96well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 100µl Reaktionspuffer versetzt. Der Reaktionspuffer enthielt das Tetrazolium-Salz 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid und als Katalysator Diaphorase. Im Dunkeln wurde 30min inkubiert. Die Auswertung fand mit einem Mikrotiterplatten-Photometer statt bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 620nm.

Zur Berechnung der Zytotoxizität waren des weiteren ein Mediumleerwert (ML), ein Wert für die in Medium gelöste Substanz, für den Fall, daß diese die Reaktion beeinflusst, ein Wert für die LDH-Aktivität bei unbehandelten Zellen (minK) und ein Wert für maximale LDH-Aktivität (maxK), der durch Zugabe von 2% Triton X 100 zu den Zellen erstellt wurde, erforderlich.

Errechnung der Zytotoxizität:

$$\frac{(Absorption - ML) - (\min K - ML)}{\max K - \min K} \times 100 = \text{Zytotoxizität in \%}$$

6.11.3 Bestimmung der Zytotoxizität durch Quantifizieren des DNA-Gehalts

Hep G2-Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet, in Medium suspendiert und nach Zählung mit einem Casy Zellzählgerät auf 50000 Zellen/ml eingestellt. 1ml der Zellsuspension wurde in jedes well einer 24well-Platte eingesät. Nach 24h wurde das Medium abgesaugt und mit 1ml frischem Medium ersetzt und die zu prüfenden Substanzen hinzugefügt. Nach 24 oder 72h Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen bei -20°C eingefroren. Nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen wurde jedes well mit 100µl Aqua dest. versetzt, bei 37°C

1h inkubiert und dann erneut eingefroren. Nach erneutem Auftauen wurde in jedes well 300µl eines Puffers mit folgender Zusammensetzung pipettiert:

Na₂HPO₄•12H₂O 1,96g
NaH₂PO₄•H₂O 0,164g
NaCl..... 15,6g
EDTA 0,1g

Es wurde auf 100ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und vor Gebrauch 1:0,25 verdünnt.

In Eppendorfgläsern wurden nun 30µl bisBenzimid-Lösung (10µg/ml in destilliertem Wasser) vorgelegt, mit 270µl der Zellsuspension vermischt und dann auf 1500µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden dann fluorimetrisch bei einer Emissionswellenlänge von 356nm und einer Excitationswellenlänge von 458nm vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Kalibrierungsgeraden.

6.12 Nachweismethoden für Apoptose

6.12.1 DNA-Leiter

2x10⁶ Zellen wurden für 4 und 24h mit 0,05 mM FLM 5011 inkubiert. Dann wurden sie mit einem *cellscraper* geerntet, in 10mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan HCl-Puffer (TRIS HCl) pH7 suspendiert und bei 1500g für 5min zentrifugiert. Nun folgte die Lyse der Zellen mit Hilfe von 400µl Lysepuffer.

Lysepuffer: Tris HCl..... 10mM
EDTA 10mM
Triton X 100 0,2%
pH 7,5

Nach einer Inkubation von 2min auf Eis wurde wiederum zentrifugiert bei einer Beschleunigung von 13000g für 10min. Der Überstand wurde extrahiert mit einer Chloroform/Phenol-Mischung 1:1.

Die wässrige Phase wurde schließlich mit 1/10 Volumen 1M Natriumacetat-Puffer pH 7 versetzt.

Nach Hinzufügen von 2 Volumenteilen 96% Ethanol wurde 20min bei -20°C inkubiert und schließlich bei 13000g für 15min zentrifugiert. Im Pellet befand sich nun die DNA, die nochmals mit 70% Ethanol gewaschen wurde. Nach Resuspension in 200µl TE-Puffer wurde die Probe

30min bei 37°C mit 0,1mg RNase behandelt.

TE-Puffer: Tris HCl..... 10mM
EDTA 1mM
pH 8,0

Die Probe wurde 1:1 mit dem Auftragepuffer vermischt und für die Elektrophorese aufgetragen.
Die DNA-Elektrophorese wurde bei 100V und 100mA in einem 1,5% Agarosegel für 1h in TAE-Puffer durchgeführt.

Auftragepuffer: Glycerin 50% (v/v)
Natrium Dodecylsulfat..... 0,2%
Bromphenolblau..... 0,05%
Xylencyanol 0,05%
in TAE Puffer

TAE-Puffer: Tris-Base 2M
Essigsäure..... 1M
EDTA..... 0,1M
pH 8,3
vor Gebrauch 1:50 zu verdünnen

Die DNA wurde visualisiert durch 10-30 minütiges Behandeln mit einer 0,001‰ Ethidiumbromid-Lösung. Nach waschen in destilliertem Wasser konnte das Agarosegel unter einer UV-Lampe bei 366nm betrachtet werden.

6.12.2 Anfärben von apoptotischen Zellen mit Annexin-V-Biotin

Zum Färben der mit FLM 5011 für 4h inkubierten Zellen wurden 10^5 Hep G2-Zellen mit 100µl Annexin-V-Biotin Lösung für 15min inkubiert. Anschließend wurden sie 2mal mit Puffer gewaschen.

Waschpuffer: HEPES 10mM
NaCl..... 140mM
CaCl₂ 5mM

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Nun wurden die Zellen luftgetrocknet und

schließlich mit einer Methanol/Ethanol-Mischung 1:1 fixiert. Wieder wurde luftgetrocknet und dann mit 100µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat-Lösung 1h inkubiert. Ein weiterer Waschschriff wurde angeschlossen und dann 100µl der Substratlösung, die Diaminbenzidin enthielt, hinzugefügt. Nach 15min und einem erneuten Waschschriff konnten die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden, wobei die apoptotischen Zellen rotbraun angefärbt waren. Als Kontrolle wurde eine weitere Kultur, die kurz mit Trypanblau behandelt wurde, betrachtet, um ein Anfärben von nekrotischen Zellen auszuschließen.

6.12.3 ApoAlert FLICE Assay von CLONTECH Laboratories

5×10^5 Hep G2-Zellen wurden mit 0,05mM FLM 5011 für 1h, 4h und 24h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und bei 200g für 5min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 50µl eiskaltem Zell-Lyse-Puffer resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert.

Das Zellysat wurde wiederum für 3min bei 12000g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde nun mit 50µl Reaktionspuffer, der 10mM Dithiotreitol enthielt, und 5µl 1mM IETD-AFC (Isoleucin-Glutamat-Threonin-Aspartat-7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin), dem konjugiertem FLICE-Substrat, versetzt und 1h bei 37°C inkubiert.

Nun wurde die Fluoreszenz bei einer Exitationswellenlänge von 380nm und einer Emissionswellenlänge von 508nm gemessen. Zur Quantifizierung der Protease-Aktivität wurde eine Kalibrierungskurve aufgenommen. Dazu wurde AFC in Zell-Lyse-Puffer gelöst und die Fluoreszenzintensität (FI) von 0, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8nmol AFC gemessen.

Als Negativkontrolle fungierte eine unbehandelte Hep G2-Kultur. Als Leerwert wurde für jeden Zeitpunkt eine Probe parallel mitgeführt, die nicht mit konjugiertem FLICE-Substrat versetzt wurde.

Um sicher zu sein, daß die Fluoreszenz auf eine FLICE-Aktivität zurückzuführen ist, wurde jeweils eine Probe mit FLICE-Inhibitor versetzt. Dazu wurde direkt vor dem Zusatz des FLICE-Substrats 50µl Reaktionspuffer und 0,5µl der IETD-fmk-Inhibitor-Lösung (IETD-Fluoromethylketon) zu dem Überstand nach der Zentrifugation hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde weiterhin genauso verfahren wie mit den anderen Proben.

7 Literatur

1. Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S. (1979), Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, *Nature* **282**, 615-616
2. Anderson, K.M., Seed, T., Meng, J., Ou, D., Alrefai, W.A., Harris, J.E. (1998), 5-Lipoxygenase inhibitors reduce Panc-1 survival: the mode of cell death and synergism of MK 886 with gamma linolenic acid, *Anticancer Research* **18** (2A), 791-800
3. ApoAlert (1998) ApoAlert FLICE/Caspase-8 Fluorescent Assay Kit ClonTech
CLONTECHniques
4. Avis, I.M., Jett, M., Boyle, T., Vos, M.D., Moody, T., Treston, A.M., Martinez, A., Mulshine, J.L. (1996), Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling, *The Journal of Clinical Investigation* **97**(3), 806-813
5. Ballet, F., Bouma, M.E., Wang, S.R. (1984), Isolation, culture and characterisation of human hepatocytes from surgical liver biopsies, *Hepatology* **4**, 849-854
6. Beitz, A., Taube, C., Beitz, J., Goos, H., Graff, J., Nöhring, M., Pissarek, M., Lindenau, K.F., Mest, H.J. (1988), Beeinflussung des Trapidilderivats AR 12463 auf Eikosanoidbildung und Lipidspiegel in einem Myokardinfarktmodell des Hundes, in 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie der DDR, Halle, 5
7. Berry, M.N., Edwards, A.M., Barritt, G.J. (1991), Isolated hepatocytes, preparation, properties and applications in Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H. 21 Amsterdam Elsevier Science Publisher B.V., 272-274
8. Bielka, H., Börner, T. Molekulare Biologie der Zelle, G. Fischer, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena 1995

9. Block, H.-U., Mest, H.-J. (1988), Beeinflussung der Arachidonsäurefreisetzung und Thromboxanbildung in menschlichen Thrombozyten durch Trapidil und dessen Derivat AR 12463 in 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie der DDR, Halle, 12

10. Block, H.U., Gabbasov, Z.A., Pozin, E.Y., Popov, E.G., Mest, H.-J. (1988), Hemmung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung in menschlichen Thrombozyten durch Trapidil und dessen Derivat AR 12463 in 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie der DDR, Halle, 11

11. Bock, K.W., Bock-Hennig, B.S. (1987), Differential induction of human liver UDP-Glucuronyltransferase activities by phenobarbital-type inducers, *Biochemical Pharmacology* **36**(23), 4137-4143

12. Bouma, M.-E., Rogier, E., Verthier, N., Labarre, C., Feldmann, G. (1989), Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived Cell line Hep G2: Morphologie and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins, *In Vitro Cellular&Developmental Biology* **25**(3), 267-275

13. Chaurasia, C.S., Alterman, M.A., Lu, P., Hanzlik, R.P. (1995), Biochemical characterization of lauric acid ω -hydroxylation by a CYP 4A1/NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **317**(1), 161-169

14. Chen, Q., Galleano, M., Cederbaum, A.I. (1998), Cytotoxicity and Apoptosis produced by Arachidonic Acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P 450 2E1, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **22**(4), 782-784

15. Chinnaiyan, A., M., Vishva, M., D. (1996), The cell-death machine, *Current Biology* **6**(5), 555-562

16. Dashti, N., Wolfbauer, G. (1987), Secretion of lipids, apolipoproteins and lipoproteins by human hepatoma cell line Hep G2: effects of oleic acid and insulin, *Journal of lipid Research* **28**, 423-436

17. Dawson, J.R., Adams, D.J., Wolf, C.R. (1985), Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line Hep G2, *FEBS Letters* **183**(2), 219-222
18. Di Dinato, M., Dabizzi, R.P., Miaoli, M., Fantini, F. (1985), Acute haemodynamic effects of intravenous administration of trapidil in man, *Arzneimittel Forschung* **35**, 1295-1298
19. Dittmann, K.H., Mayer, C., Rodemann, H.P., Pertides, P.E., Denzlinger, C. (1998) MK-866, a leukotriene biosynthesis inhibitor, induces antiproliferative effects and apoptosis in HL-60 cells, *Leukotriene Research* **22**(1), 49-53
20. Doehmer, J., Die gentechnologische Konstruktion von V79-Chinesische Hamsterzellen zur stabilen Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen und ihre Anwendung in Metabolismus- und Mutagenitätsstudien Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Habilitationsschrift
21. Donato, M.T., Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J. (1991), Co-culture of hepatocytes with epithelial-like cell lines- expression of drug-biotransformation activities by hepatocytes, *Cellular Biological Toxicology* **7**, 1-14
22. Donato, M.T., Gomez-Lechon, M., Castell, J.V. (1993), A microassay for measuring cytochrome P450 1A1 and P450 2B1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates, *Anal of Biochemistry* **213**(1), 29-33
23. Donato, M.T., Gomez-Lechon, M.J., Jover, R., Nakamura, T., Castell, J.V. (1998), Human hepatocyte growth factor down-regulates the expression of cytochrome P450 isozymes in human hepatocytes in primary culture, *Pharmacology and Experimental Therapeutics* **284**(2), 760-767
24. Doostar, H., Demoz, A., Burke, M.D., Melvin, W.T., Grant, M.H. (1990), Variation in drug-metabolising enzyme activities during the growth of human Hep G2 hepatome cells, *Xenobiotica* **20**(4), 435-441
25. Doostar, H., Duthie, S.J., Burke, M.D., Melvin, W.T., Grant, M.H. (1988), The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line, *FEBS Letters* **241**(1,2), 15-18

26. Drößler, K. (1990), Immunstimulatorische und -restaurative Effekte der niedermolekularen Verbindung 3-(Mercaptoethy)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazoline(MECH) *Archiv der Pharmazie* **323**, 704

27. Dunn, J.C., Yarmush, M.L., Koebe, H.G., Tompkins, R.G. (1989), Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration, *FASEB Journal* **3**, 174-177

28. Earnshaw, W.C. Nuclear changes in apoptosis (1995), *Current opinion in Cell Biology* **7**, 337-343

29. Efthivoulou, M.-A., Berry, M.N. (1997), Antipyrine and aminopyrine induce acetaldehyde accumulation from ethanol in isolated hepatocytes, *Alcohol: Clinical Experimental Research* **21**(2), 267-274

30. Ellsworth, J.L., Erickson, S.K., Cooper, A.D. (1986), Very low and low density lipoprotein synthesis and secretion by the human hepatoma cell line Hep G2: effects of free fatty acids, *Journal of Lipid Research* **27**, 585-874

31. Evan, G., Brown, L., Whyte, M., Harrington, E. (1995), Apoptosis and cell cycle, *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 825-834

32. Falkenberg, F.W., Weichert, H., Krane, M., Bartels, I., Nagels, H.O., Behn, I., Fiebig, H., In-vitro-Produktion von monoklonalen Antikörpern in hohen Konzentrationen in neuen und einfach bedienbaren Modular-Minifermenter *in* Forschung ohne Tierversuche-1995, Edit.: Schöffl, H., Spielmann, H., Tritthahn, H.A., Cußler, K., Fuhrmann, U., Goetschl, A.F., Gruber, A.F., Heusser, C., Möller, H., Ronneberger, A., Vedani, A. Wien-New York Springer Verlag

33. Ferrini, J.-B., Pichard, L., Domergue, J., Maurel, P. (1997), Long-term primary cultures of adult human hepatocytes, *Chemico-Biological Interactions* **107**, 31-45

34. Freshney, I.R., Tierische Zellkulturen: ein Methoden-Handbuch, Berlin, New York Walter de Greyter, 1990

35. Fung, J., Thomas, P.E., Iba, M.M. (1999), Cytochrome P450 1A1 in rat peripheral blood lymphocytes: inducibility in vivo and bioactivation of benzo(a)pyrene in the Salmonelle typhimurium mutagenicity assay in vitro, *Mutation Research*, **438**(1), 1-12
36. Gebhardt, R., Mencke, D. (1979), Perfused monolayer cultures of rat hepatocytes as an improved in vitro system for studies on ureogenesis, *Experimental Cell Research* **124**, 349-359
37. Georgoff, I., Secott, T., Isom, H.C. (1984), Effect of simian virus 40 infection on albumin production by hepatocytes cultured in chemically defined medium and plated on non-collagen attachment surfaces, *Journal of Biological Chemistry* **259**, 9595-9602
38. Gerlach, J., Unger, J., Hole, O., Encke, J., Müller, Ch., Neuhaus, P. (1994), Bioreaktor zum Langzeiterhalt differenzierter hepatischer Zellfunktionen für in vitro Wirkstoffprüfungen alternativ zu Tierversuchen, *ALTEX* **11**(11), 207-215
39. Ghosh, J., Myers, C.E. (1998), Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc. Natl. Academic Sciences* **95**, (22), 13182-7
40. Götz, H. (1982), Differenzierung und funktionelle Bedeutung der Lymphozyten, *Therapiewoche* **32**, 2151-57
41. Grant, M.H., Duthie, S.J., Gray, A.G., Burke, M.D. (1988), Mixed function oxidase and UDP-glucuronidyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line, *Biochemical Pharmacology* **37**(21), 4111-4116
42. Hancock, J.T., Cell Signalling, Addison Wesley Longman Limited, Harlow, 1997
43. Heinroth-Hoffmann, I., Hauser, A., Mest, h.-J. (1986), Wirkung von Trepidil und Trepidilderivaten auf die arachsidonsäureinduzierte Blutdrucksenkung der Ratte in 25. Jahrestagung der Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie der DDR, Zinnowitz, 22

44. Heinroth-Hoffmann, I., Hauser, A., Taube, C., Mest, H.-J. (1989), Wirkung von Tapidil und der Tapidilderivate AR 12456 und AR 12463 auf pharmakologisch induzierte Blutdruckveränderungen der Ratte *in* 27. Jahrestagung der Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie der DDR, Berlin, 35
45. Huang, M.-T., Miwa, G.T., Lu, A.Y.H. (1978), Induction of rat liver cytosol methyl red azo-reductase by 3-methylcholantrene assayed by a sensitive fluorometric method, *Biochemical and Biophysical Research Communication* **83**(4), 1253-1259
46. Hukkanen, J., Hakkola, J., Attila, S., Piipari, R., Karjalainen, A., Pelken, O., Raunio, H. (1997), Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolising cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes, *Molecular Carcinogenesis* **20**, 224-230
47. Ikeda, H., Takahashi, K., Sato, S., Sasaki, H., Ito, E., Yasui, S. (1984), Bronchodilatory effects of trapidil in man, *Arzneimittel Forschung* **34**, 309-313
48. Kern, A., Bader, A., Pichlmayr, R., Sewing, K.-F. (1997), Drug metabolism in hepatocyte sandwich culture of rats and humans, *Biochemical Pharmacology*, **54**, 761-772
49. Kim, H.M., Ha, J.R., Park, K.S., Yang, K.H. (1986), Presence of Hexobarbital in primary cultures of rat hepatocytes maintains cytochrome P450 levels and drug metabolizing enzyme activity, *Drug Chemical Toxicology*, **11**, 29-41
50. Kleber, H.-P., Schlee, D., Schöpp, W., Biochemisches Praktikum, 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1990
51. Klein, J., Immunologie, Edit. Schmidt, R.E., 1. Weinheim, New York, Basel VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1991
52. Knowels, B.B., Howe, C.C., Aden, D.P. (1980), Human hepatoblastoma cell line secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science* **209**, 497-499
53. Koebe, H.-G., Pahernik, S., Eyer, P., Schildberg, F.W. (1994), Collagen gel immobilization: a useful cell culture technique for long- term metabolic studies on human hepatocytes, *Xenobiotica* **24**(2), 95-107

54. Korystov, Y.N., Shaposhnikova, V.V., Levitman, A.A., Kudryavtsev, A.A., Kublik, L.N., Narimanov, A.A., Orlova, O.E. (1998), The effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on proliferation and death of tumor cells, *FEBS Letters* **431**, 224-226
55. Küpper, W. (1989), Sind Tierversuche ethisch vertretbar? *Krankenhauspharmazie* **10**, 1-4
56. Labarca, C., Paigen, K. (1980), A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure, *Anal of Biochemistry* **102**, 344-352
57. Langner, A, Komplementäre Methoden zur Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen, Humboldt-Universität zu Berlin, Habilitationsschrift, 1993
58. Langner, A., Borchert, H.-H., Pfeifer, S. (1990), Postoxydation Enzymes *in* Frontiers in Biotransformation , Edit. Ruckpaul, K ., Rein, H., Akademie Verlag, 150-206
59. Langner, A., Melzig, M.F., Kempa, S., Krause, A. (1995), Die Verwendung von Lymphozytenkulturen für Untersuchungen zur Biotransformation von Arzneistoffen *Pharmazie* **50**(2), 130-138
60. Langner, A., Rentsch, C., Nerlich, C., Rittner, I., Kühn, H., Schewe, T., Franke, P. (1996), Untersuchungen zur Biotransformation des Lipxygenasehemmers 2-Hydroxy-5-methylauropfenon-oxim, *Pharmazie* **51**(6), 403-409
61. Leistner, S., Drößler, K. (1990), Kurzdokumentation über eine oral applizierbare Substanz mit immunstimulierender und immunrestaurativen Wirkung, Leipzig
62. Levine, W.G., Raza, H. (1988), Mechanism of Azoreduction of dimethyl-aminoazobenzene by rat liver NADPH-cytochrome P450 reductase and partially purified cytochrome P450, *Drug Metabolism and Disposition* **16**(3), 441-447
63. Li, A.P., Maurel, P., Gomez-Lechon, M.J., Cheng, L.C., Jurima-Romet, M. (1997), Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of Cytochrome P450, *Chemico-Biological Interactions* **107**, 5-16
64. Lindberg, R.P.L., Negishi, M. (1989), Alteration of mouse cyrochrome P450_{coh} substrate specifity by mutation of a single amino-acid residue, *Nature* **339**, 632-634

65. Lindl, T., Bauer, J., Zell- und Gewebekultur 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1989
66. Löffler, G., Petrides, P., Biochemie und Pathobiochemie, 6.Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1998
67. Mackenzie, P.I. (1990), Structure and Regulation of UDP Glucuronidyltransferase *in* Frontiers in Biotransformation 6, Edit. Ruckpaul, K ., Rein, H., Akademie Verlag, 211-241
68. Marinovich, M., Lorenzo, J.L., Flaminio, L.M., Granata, A., Galli, C. (1987), The Hep G2 cell line as a possible alternative to isolated hepatocytes in cytotoxicity studies, *3rds Italian Tissue culture Meeting*, 16-22
69. Martin, S.J., Green, D.R., Cotter, T.G. (1994), Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery, *Trends in Biological Sciences* **19**, 26-30
70. Matsubara, T., Yamada, N., Mitomi, T., Yokoyama, S., Fukiishi, Y., Hasegawa, Y., Nishimura, H. (1986), Cytochrome P450-dependent monooxygenase activities in prenatal and postnatal human livers: comparison of human liver 7-alkoxycoumarin O- dealkylases with rat liver enzymes, *Japanese Journal of Pharmacology* **40**, 389-398
71. Matthes, B., Grah, C., Biesenthal, S., Matthes, H. (1998), Übersicht von Heilversuchen zur Therapie bei Hepatitis C mit Abnoba viscum und Solanum lycopersicum, *Gastroenterologie*, 360-367
72. Matthes, H., Grah, C., Biesenthal, S. (1997), Therapiestudie zur Hepatitis C mit Abnoba Viscum und Solanum lycopersicum, *Der Merkurstab Sonderheft* **26**
73. McConkey, D., Orrenius, S. (1994), Signal transduction pathways to apoptosis, *Trends in Cell Biology* **4**, 370-375

74. Mentz, G., Mentz, P., Mest, H.J. (1986), Effekte kardiotoner Pharmaka im Vergleich mit einem Tapidilderivat (AR12463) an hypoxisch und arrhythmogen geschädigten isolierten Herzpräparaten des Meerschweinchens *in* 25. Jahrestagung der Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie der DDR, Zinnowitz, 23
75. Nash, T., The colorimetric estimation of formaldehyde by means of Hantzsche reaction (1953), *Biochemical Journal* **55**, 416-421
76. Noguchi, K., Tomoike, H., Kawachi, Y., Nabeyama, S., Shimokawa, H., Maruoka, Y., Nakamura, M. (1984), Effects of trapidil and nitroglycerin on coronary circulation in conscious dogs, *Arzneimittel Forschung* **34**, 872-876
77. Nyberg, S.L., Remmel, R.P., Mann, H.J., Peshwa, M.V., Hu, W.-S., Cerra, F.B. (1994), Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as source of biotransformation functions in a bioartificial liver, *Annals of Surgery* **220**(1), 59-67
78. Parke, D.V. (1984), Principles, mechanism and biological consequences of induction *in* Frontiers in Biotransformation 2, Edit. Ruckpaul, K., Rein, H. Akademie-Verlag Berlin 2-31
79. Pfeifer, S., Pflegel, P., Borchert, H.-H., Grundlagen der Biopharmazie, Verlag Chemie, Weinheim, 222-227
80. Pharmacia Fine Chemicals, Microcarrier cell culture, Almquist&Wiksell Tryckeri AB, Uppsala, 1981
81. Raza, H., Levine, G. (1986), Azoreduction of N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene(DAB) by rat hepatic microsomes, *Drug Metabolism and Disposition* **14**(1), 19-24
82. Rogiers, V., Adriaenssens, L., Vandenberghe, Y., Gepts, E., Callaerts, A., Vercruysse, A. (1986), Critical evaluation of 7-ethoxycoumarin-O-deethylase activity measurement in intact isolated rat hepatocytes, *Xenobiotica* **16**(9), 817-826
83. Rogiers, V., Vandenberghe, Y., Callaerts, A., Snock, W., Vercruysse, A. (1990), Effect of dimethylsulfoxide on phase I and II biotransformation in cultured rat hepatocytes, *Toxicology in vitro* **4**(4,5), 439-442

84. Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1991
85. Morgan, S.J., Darling, D.C., Kultur tierischer Zellen, 1.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Oxford, Berlin, 1994
86. Sakagushi, M., Omura, T. (1993), Topology and biogenesis of microsomal cytochrome P-450 in *Frontiers in Biotransformation: Medicinal implications in cytochrome P-450 catalyzed biotransformation* 8, Edit. Ruckpaul, K., Rein, H., Akademie Verlag, Berlin
87. Sassa, S., Sugati, O., Galbraith, R.A., Kappa, A. (1987), Drug metabolism by the human hepatoma cell Hep G2, *Biochemical and Biophysical Research Communication* **143**(1), 52-57
88. Schade, R., Pfister, C., Halatsch, R., Henklein, P. (1991), Polyclonal igY antibodies from chicken egg yolk-an alternative to the production of mammalian igG type antibodies in Rabbits, *ATLA* **19**, 403-419
89. Schepers, G., Aschmann, C., Mörchel, S. (1990), The use of primary cultured rat hepatocytes for the assessment of xenobiotic effects on biotransformation, *Scandinavian Cell Toxicology Congress* **7**, 209-213
90. Schewe, T., Kühn, H., Loose, S., Lücke, L. (1991), Pharmacological profile, pharmacokinetics and biotransformation of 5-lipoxygenase inhibitor FLM 5011 in Prostaglandins, leukotrienes, lipoxines and PAF. Edit. J.M.Bailey, New York, 383
91. Schulz, J., Dettlaff, S., Fritzsche, U., Harms, U., Schiebel, H., Derer, W., Fusenig, N.E., Hülsen, A., Böhm, M. (1994), The amido black assay: a simple and quantitative multipurpose test of adhesion, proliferation and cytotoxicity in microplate cultures of keratinocytes (HaCaT) and other cell types growing adherently or in suspension, *Journal of immunological methods* **167**, 1-13
92. Schunack, W., Mayer, K., Haake, M., Arzneistoffe, 2. Auflage, Friedrich Vieweg&Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig, 1983

93. Seglen, P.O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells Prescott, D.M. *Methods in cell biology* **13**, 29-83
94. Shimeno, H., Toda, A., Nagamatsu, A., Shigematsu, H. (1988), Aminopyrine metabolism in primary monolayer cultures of diabetic rat hepatocytes, *Xenobiotica* **18**(5), 551-560
95. Shipley, L.A., Eacho, P.I., Sweeney, D.J., Weiner, M. (1986), Inhibition of Glucuronidation and Sulfation by Dibutyl cyclic AMP in isolated rat hepatocytes, *Drug Metabolism and Disposition* **14**(5), 526-531
96. Siegling, A., Drößler, K., Strohschneider, T., Leistner, S. (1990), Darstellung potentiell immunstimulierender 3-(Alkylthioalkyl)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazoline, *Archiv der Pharmazie* **323**, 735
97. Simpson, A.E. (1997), The cytochrome P450 4 family, *Genetic Pharmacology* **28**(3), 351-359
98. Soucek, P. and Gut, I. (1992), Cytochromes P-450 in rat: structures, functions, properties and relevant human forms, *Xenobiotica* **22**(1), 83-103
99. Soulinna, E.-M., Pitkäranta, T. (1986), Effect of culture age on drug metabolising enzymes and their induction in primary cultures of rat hepatocytes, *Biochemical Pharmacology* **35**(13), 2241-2245
100. Spielmann, H. (1994), In-Vitro-Methoden in Lehrbuch der Toxicologie, Edit. Marquardt, H., Schäfer, S., 1. Auflage, BI-Wissenschaftlicher Verlag, Leipzig, 814-820
101. Stephen, P.D., Draushuk, A.T., Olson, J.R. (1997), Cytochrome P450 1A1 induction in rat lymphoid tissues following in vivo and in vitro exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires protein kinase C, *Toxicology* **124**(1), 39-51
102. Stoddart, A.M., Levine, W.G. (1989), Azoreduction of dimethylaminoazobenzene (DAB) in primary cultures of rat hepatocytes, *Drug Metabolism and Disposition* **18**(1), 36-41
103. Takahashi, A., Earnshaw, W.C. (1996), ICE-related proteases in apoptosis, *Current*

104. Tang, D., G., Chen, Y., Q., Honn, K., V. (1996), Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis, *Proc. Natl. Academic Sciences* **93** 5241-5246
105. Tatsumi, K., Ishigai, M. (1987), Oxime-metabolising activity of liver oxidase, *Archives of biochemistry and biophysics* **253**, 413-418
106. Teuscher, E., Lindequist, U., Biogene Gifte, 2.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994
107. Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P., Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1989
108. Trauth, B.C., Keeseey, J. (1996); Guide to cell proliferation and apoptosis methods, Boehringer Mannheim
109. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutlingsperger, C. A (1995), Novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *Journal of Immunological Methods* **184**, 39-51
110. Wallace, D.M. (1987), Large- and small-scale phenol extraction, *Methods in Enzymology* **152**, 33-50
111. Yuan, J. (1995), Molecular control of life and death, *Current opinion in Cell Biology* **7**, 211-214
112. Zychlinski, L., Raska-Emery, P., Montgomery, M.R. (1988), Artefacts in the determination of microsomal N-demethylation in the presence of ascorbic acid Tris buffer and Nash reagent, *Xenobiotica* **18**, 485-490

Danksagung

Für die geduldige und freundliche Unterstützung und für die fachliche Beratung bei der Anfertigung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. habil. A. Langner.

Für die Ermöglichung der Durchführung der Promotion und für wertvolle Hinweise bedanke ich mich bei Prof. Dr. habil. H.-H. Borchert.

Ich bedanke mich für die praktische Hilfe bei Frau I. Dobbrodt, Frau K. Schirmer und Herrn C. Melzer.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. P. Witte und Herrn Ing. H. Döhnert für die Hilfe bei der GC/MS.

Herrn Dr. Zipper und Herrn Dr. Fickel vom Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bzw. für die Aufnahmen der Elektropherogramme. Frau Loose vom Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie danke ich für das Auftauen und Einfrieren der Hep G2-Zellen.

Herrn Dr. Matthes vom Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe danke ich ebenfalls für die Zusammenarbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Juni 1999